

Université de Montréal

**MODULATION DE LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE PAR LE  
CMH DE CLASSE II : UTILISATION DE HLA-DO DANS LES  
CELLULES DENDRITIQUES**

Par

Angélique Bellemare-Pelletier

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)  
En microbiologie et immunologie

Août 2004

© Angélique Bellemare-Pelletier



W

4

U58

2005

V.071

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**MODULATION DE LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE PAR LE  
CMH DE CLASSE II : UTILISATION DE HLA-DO DANS LES  
CELLULES DENDRITIQUES**

Présenté par :  
Angélique Bellemare-Pelletier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

**Dr Yves Langelier**

Président-rapporteur

**Dr Jacques Thibodeau**

Directeur de recherche

**Dr Idriss Djilali-Saiah**

Membre du jury

## RÉSUMÉ

Le présent ouvrage passera en revue un des événements essentiels à l'élaboration d'une réponse immunitaire : la présentation antigénique par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Au cours de ce processus, les antigènes interceptés par une cellule présentatrice d'antigènes professionnelle (CPA) sont découpés en peptides et chargés sur les molécules du CMH II. Les complexes ainsi formés sont présentés à la surface cellulaire et reconnus par les cellules T CD4<sup>+</sup> qui déclenchent la réaction immunitaire. Il sera aussi question de l'implication d'autres intermédiaires dans la présentation antigénique, dont les molécules du CMH II dites non-classiques. HLA-DO (DO), principalement exprimée dans les lymphocytes B, joue un rôle important dans la modulation du répertoire de peptides antigéniques pouvant être présenté. En effet, la molécule DO est capable d'inhiber l'activité de HLA-DM (DM), une autre molécule non-classique impliquée dans le chargement des peptides sur les molécules du CMH II classiques. Des travaux incluant mes résultats sur la régulation de DO ont déjà été publiés (1,2), mais ne figurent pas dans ce travail. Nous examinerons ici l'effet de DO dans les cellules dendritiques (CD), un type de CPA très efficace dans le développement de la réponse immunitaire primaire. Nous verrons que dans ces cellules, la molécule DO, transduite à l'aide d'un adénovirus, se retrouve dans les endosomes DM<sup>+</sup>, CD63<sup>+</sup>. De plus, l'observation d'une augmentation de la quantité de molécules du CMH II associées au peptide CLIP à la membrane plasmique confirme le rôle de DO comme inhibiteur de DM. Nous observerons aussi que l'expression de DO n'affecte pas la capacité des CD à activer les cellules T dans les réactions lymphocytaires mixtes (MLR). Enfin, nous verrons que la

présentation de l'antigène exogène gp100 se trouve diminuée en présence de DO. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que DO est fonctionnel dans les CD et possède le potentiel de faire varier leur répertoire peptidique. Cette variation pourrait avoir un effet bénéfique, par exemple sur la présentation d'épitopes tumoraux. Nous analyserons finalement les possibilités d'immunothérapies impliquant des CD exprimant DO.

## **MOTS CLÉS**

Cellules B

Cellules présentatrices d'antigènes professionnelles

HLA-DM

Épitopes cryptiques

Immunothérapies

Molécules du CMH II non-classiques

Peptides tumoraux

Répertoire peptidique

## SUMMARY

This work will describe one of the most important events of the immune response development: the antigenic presentation by the class II major histocompatibility complex (MHC). During this process, engulfed antigens by professional antigen presenting cells (APCs) are digested into peptides which are loaded onto class II molecules. These complexes are presented on cell surface to CD4<sup>+</sup> T cells in order to activate the immune response. The involvement of many proteins in the antigenic presentation, including the non-classical MHC class II molecules, will also be discussed. HLA-DO (DO), almost exclusively found in B lymphocytes, plays an important role as a modulator of the antigenic peptide repertoire that can be presented. In fact, DO is able to inhibit HLA-DM (DM), another non-classical class II molecule involved in peptide loading on classical class II molecules. Papers including my results have already been published (1,2) but will not figure in this work. Here we will examine the effect of DO expression in dendritic cells (DCs) which are very efficient in the development of primary immune responses. We will see that the DO molecule transduced by an adenovirus in those cells is found in DM<sup>+</sup>, CD63<sup>+</sup> endosomes. Moreover, the increased amount of the CLIP peptide complexed to MHC II molecules at the plasma membrane confirms the inhibitory role of DO on DM. We will also demonstrate that the DO expression do not affect the capacity of DCs to activate T cells in mixed lymphocyte reactions (MLRs). At last, we will observe that DO decreases the presentation of exogenous gp100 antigen. Overall, the results suggest that DO is functional in DCs and have the potential to modulate their peptide repertoire. For exemple, this variation could have positive consequences on the presentation of tumor epitopes.



Finally, we will analyse possible immunotherapies involving DO-expressing DCs.

**KEY WORDS**

B cells

Cryptic epitopes

HLA-DM

Immunotherapies

Non-classical class II molecules

Peptide repertoire

Professional antigen presenting cells

Tumour peptides

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
MOTS CLÉS .....	III
SUMMARY.....	IV
KEY WORDS .....	VI
TABLE DES MATIÈRES .....	VII
LISTE DES FIGURES.....	X
Chapitre 1; Revue de littérature .....	x
Chapitre 3 ; Discussion.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
DÉDICACE .....	XIII
CHAPITRE 1 ; REVUE DE LITTÉRATURE.....	14
1.0 INTRODUCTION.....	15
1.1 LES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II .....	17
1.1.1 La région du CMH de classe II.....	17
1.1.2 La structure des molécules du CMH de classe II.....	18
1.1.3 Les peptides présentés par les molécules du CMH de classe II.....	19
1.2 LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE DANS LE CONTEXTE DU CMH DE CLASSE II .....	21

1.2.1 L'assemblage des molécules du CMH de classe II.....	21
1.2.2 Destination des molécules du CMH de classe II : les compartiments endosomiques ou MIIC.....	24
1.2.3 L'apprêtement et la présentation de peptides.....	25
1.3 LA MOLÉCULE DU CMH DE CLASSE II NON CLASSIQUE HLA- DM .....	26
1.3.1 Expression de HLA-DM .....	26
1.3.2 La structure et la localisation de HLA-DM .....	27
1.3.3 La fonction de HLA-DM .....	27
1.4 LA MOLÉCULE DU CMH DE CLASSE II NON CLASSIQUE HLA- DO.....	28
1.4.1 L'expression de HLA-DO .....	28
1.4.2 La structure et la localisation de HLA-DO .....	29
1.4.3 La fonction de HLA-DO .....	30
1.5 LES CELLULES DENDRITIQUES .....	32
1.5.1 L'origine des cellules dendritiques.....	33
1.5.2 Le cycle de vie des cellules dendritiques.....	34
1.5.3 La présentation antigénique par les cellules dendritiques .....	35
1.5.4 L'immunité anti-tumorale et l'immunothérapie utilisant les cellules dendritiques transduites avec l'adénovirus.....	40
1.6 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL.....	44
CHAPITRE 2; ARTICLE .....	45
CHAPITRE 3; DISCUSSION .....	94

<b>3.0 HYPOTHÈSE .....</b>	<b>95</b>
<b>3.1 UTILISATION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES DÉRIVÉES DE MONOCYTES .....</b>	<b>95</b>
<b>3.2 CHOIX DE L'ADÉNOVIRUS COMME VECTEUR DE TRANSFERT .....</b>	<b>96</b>
<b>3.3 LE COMPORTEMENT DE HLA-DO DANS LES CELLULES DENDRITIQUES .....</b>	<b>97</b>
<b>3.4 L'EFFET DE HLA-DO SUR LA PRÉSENTATION D'ANTIGÈNES TUMORAUX .....</b>	<b>99</b>
<b>3.5 UTILITÉ DE HLA-DO DANS LES CELLULES DENDRITIQUES .....</b>	<b>100</b>
<b>CHAPITRE 4; CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>104</b>
<b>CHAPITRE 5; RÉFÉRENCES .....</b>	<b>108</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>CXXXVI</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>CXXXVII</b>
<b>LISTE ET ACCORD DES COAUTEURS.....</b>	<b>CXXXVIII</b>

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre 1; Revue de littérature

<b>Figure 1.1</b> Reconnaissance d'un antigène par une cellule T CD4 <sup>+</sup> ...	<b>16</b>
<b>Figure 1.2</b> Locus du complexe majeur d'histocompatibilité humain...	<b>18</b>
<b>Figure 1.3</b> Structure de la molécule du CMH de classe II.....	<b>20</b>
<b>Figure 1.4</b> Structure de la niche peptidique des molécules du CMH de classe II.....	<b>21</b>
<b>Figure 1.5</b> Fragments de dégradation de la chaîne invariante (Ii) .....	<b>23</b>
<b>Figure 1.6</b> Voie de la présentation antigénique par le CMH II .....	<b>24</b>
<b>Figure 1.7</b> Cycle de vie des cellules dendritiques.....	<b>36</b>
<b>Figure 1.8</b> Présentation antigénique par le CMH II dans les cellules dendritiques .....	<b>38</b>
<b>Figure 1.9</b> Réponse anti-tumorale par les cellules dendritiques.....	<b>41</b>
<b>Figure 1.10</b> Cycle viral de l'adénovirus.....	<b>43</b>

### Chapitre 3 ; Discussion

<b>Figure 3.1</b> L'Évasion tumorale par la perte d'épitopes immunodominants.....	<b>102</b>
---	------------

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAT : Antigènes associés aux tumeurs

Ac : Anticorps

Ad : Adénovirus

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BCR : Récepteur des lymphocytes B (*B cell receptor*)

CIITA : *Class II transactivator*

CAR : Récepteur de l'adénovirus et du virus Coxsackie B (*Coxsackie B and adenovirus receptor*)

CG : Centres germinatifs

CPA : Cellule présentatrice d'antigènes

CLIP : *Class II-associated invariant chain peptide*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CD : Cellules dendritiques

CDi : Cellules dendritiques immatures

CDint : Cellules dendritiques interstitielles

CDm : Cellules dendritiques matures

CTL : Lymphocytes T cytotoxiques (*Cytotoxic T lymphocytes*)

DM : HLA-DM

DO : HLA-DO

DR : HLA-DR

EndoH : Endoglycosidase H

EPA : Endopeptidase à asparagine

GM-CSF : *Granulocytes Monocytes Colony Stimulating Factor*

HLA : *Human leukocyte antigen*

HPLC : *High pressure liquid chromatography*

Ig : Immunoglobuline

Ii : Chaîne invariante (*Invariant chain*)

IFN : Interféron

IL4 : Interleukine 4

IP : Immunoprécipitation

IRES : *Internal Ribosome Entry Site*

KDa : Kilodaltons

LPS : Lipopolysaccharides

MIIC : Compartiments du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (*Major-histocompatibility-complex class II compartments*)

MLR : Réaction lymphocytaire mixte (*Mixed lymphocyte reaction*)

MOI : Multiplicité d'infection (*Multiplicity of infection*)

MS : Spectroscopie de masse (*Mass spectroscopy*)

NK : *Natural killers*

RE : Réticulum endoplasmique

TAP : *Transporter associated with antigen processing*

TCR : Récepteur de lymphocytes T (*T cell receptor*)

TNF : *Tumor necrosis factor*



## DÉDICACE

Les lignes du présent ouvrage renferment plus de trois ans d'efforts, de sacrifices, d'espoirs effondrés mais toujours reconstruits, de découvertes motivantes et de fierté intense. Tout ce temps, je l'ai passé entouré de gens qui m'ont soutenue et encouragée. Je tiens donc à leur rendre hommage par le biais de ce résumé du temps passé. À Étienne, la seule personne ayant pu comprendre et partager mes états d'âme. À Papa et Maman, dont la fierté à mon égard m'aura toujours fait foncer dans la vie tête haute. À Jacques, dont je suis reconnaissante de m'avoir pris sous son aile, de m'avoir donné une chance de prendre une expérience précieuse et d'avoir cru en moi. À mon frère et ma Grand-maman qui avaient donc hâte que je sorte de l'école, mais qui m'ont toujours encouragée jusqu'à la fin. À tous les membres du laboratoire, particulièrement Alexzande qui me disait toujours : « fais-toi z'en pas Angie... », Nath avec qui je pouvais me vider le cœur et parler de choses de filles, Sam toujours de bonne humeur et disponible pour les bobos informatiques, Franchisco pour son humour dont j'étais le meilleur public, Georgio avec qui j'ai eu des discussions enrichissantes, Jessy dont la motivation était contagieuse. Aux nombreuses autres personnes que je ne nomme pas mais qui sauront se reconnaître et qui m'auront envoyé des pensées positives tout au long de ma maîtrise.

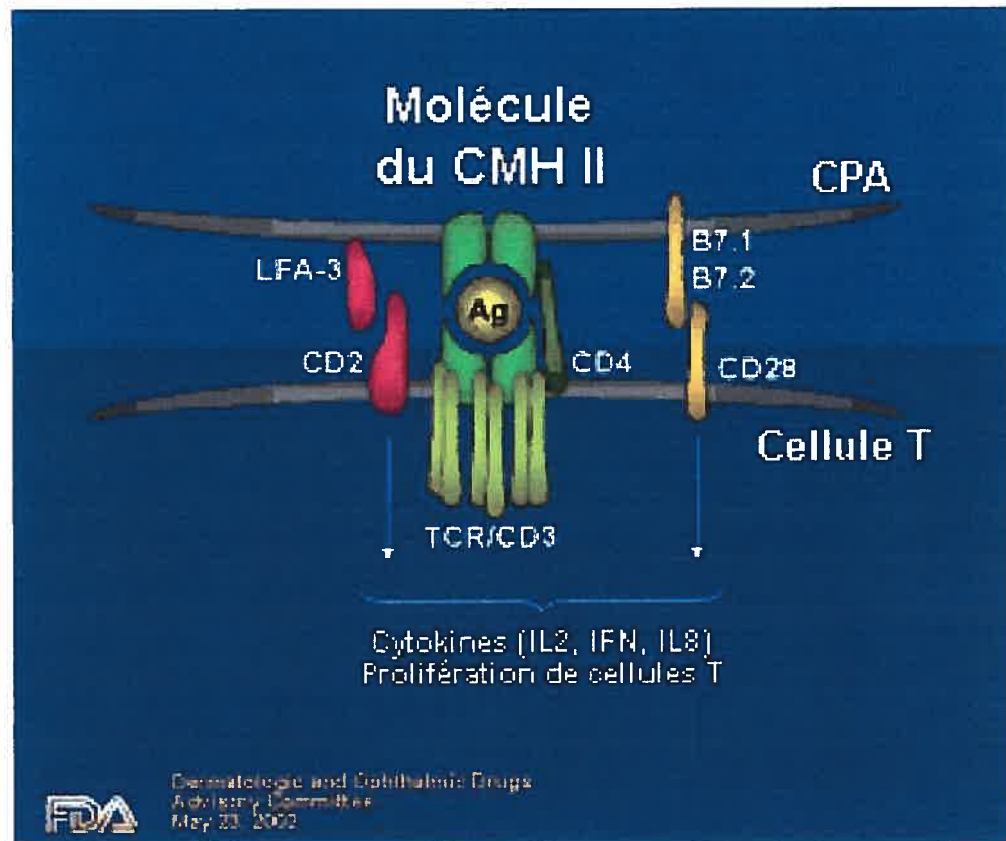
## **CHAPITRE 1 ; REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1.0 INTRODUCTION

Dû à la diversité des organismes toujours grandissante sur terre, l'évolution a forcé le système immunitaire animal à s'adapter et à se complexifier pour résister aux nouvelles offenses rencontrées. Face à un pathogène, le corps peut monter une réponse immunitaire innée non spécifique et/ou acquise spécifique. Un des événements primordiaux de cette dernière est la reconnaissance, par un lymphocyte T régulateur  $CD4^+$ , d'un peptide antigénique lié sur une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II présenté à la surface d'une cellule présentatrice d'antigènes professionnelle (CPA) [Figure 1.1] (3,4). Celui-ci est alors activé et permet la synthèse de cytokines, qui à leur tour, occasionnent, entre autres, l'activation des macrophages, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et B ainsi que la synthèse d'anticorps (Ac) (5).

La rencontre d'un antigène exogène, pouvant provenir de protozoaires, de bactéries, de virus, de protéines solubles ou de toxines (6) occasionne des bouleversements à l'intérieur de la CPA et dans son entourage. L'antigène est dégradé en fragments chargés sur des molécules du CMH II que la cellule synthétise en même temps que d'autres molécules importantes impliquées dans le processus de présentation antigénique. Le mécanisme de présentation comporte plusieurs aspects et sera discuté en détails dans les prochaines lignes.

Les CPA constituent des joueurs indispensables dans la défense de l'organisme contre les pathogènes. Chaque type de CPA possède des caractéristiques propres, faisant d'elles des cellules très spécialisées et uniques. D'ailleurs, au cours de ce travail, nous parlerons plus amplement de ces spécialistes, plus particulièrement des cellules dendritiques et leur implication potentielle en immunothérapie.



**Figure 1.1 Reconnaissance d'un antigène par une cellule T CD4+.**

Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA) dégradent les antigènes en peptides qui sont chargés dans la niche des molécules du CMH II. Les complexes sont exprimés à la surface cellulaire et reconnus par le récepteur des cellules T CD4<sup>+</sup>. Les molécules de costimulation (B7.1/B7.2 et CD28) sont nécessaires pour assurer leur division et leur différenciation.

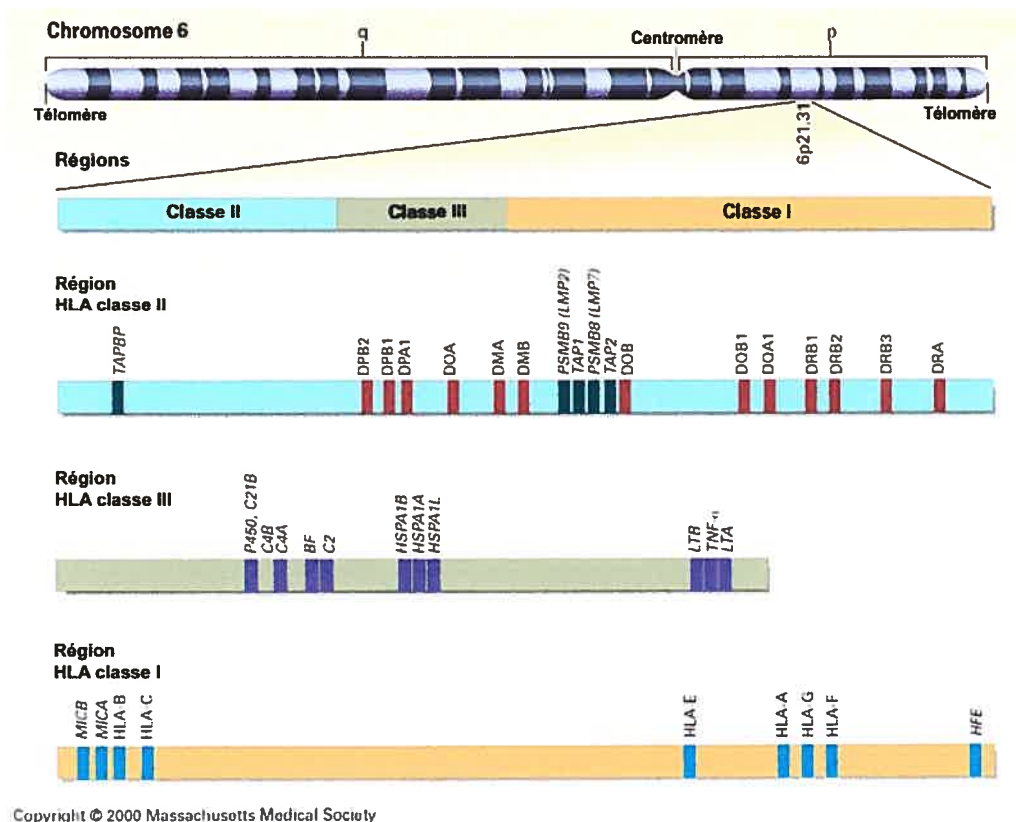
(Adapté de [www.fda.gov/.../3865S1\\_01\\_FDA-bonvini/sld004.htm](http://www.fda.gov/.../3865S1_01_FDA-bonvini/sld004.htm))

## 1.1 LES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II

### 1.1.1 La région du CMH de classe II

La région du CMH, aussi nommée HLA (*human leucocyte antigen*) est une zone assez étendue du génome qui se trouve sur le chromosome 17 chez la souris et 6 chez l'humain [Figure 1.2]. Elle contient les gènes qui codent pour les molécules du CMH de classe I et II ainsi que pour plusieurs autres protéines, dont certaines sont impliquées dans la biosynthèse des molécules du CMH ou régulent le chargement antigénique de ces dernières. Il est à noter que certains des gènes du CMH sont les plus polymorphiques de tout le génome (7). Le contrôle de la transcription des gènes du CMH de classe II est assuré par le régulateur CIITA (*class II transactivator*) (8,9). Toutefois, CIITA ne se lie pas directement à l'ADN, mais interagit plutôt avec des facteurs de transcription comme RFX-5 (10,11).

Le produit des gènes du locus du CMH est largement modulé au niveau de la transcription selon le type cellulaire et par des stimuli inflammatoires incluant les cytokines. En général, les molécules de classe I sont exprimées à la surface de presque tous les types cellulaires, alors que les molécules de classes II sont seulement exprimées par les CPA. Celles-ci incluent les cellules dendritiques, les lymphocytes B, les macrophages, les cellules épithéliales thymiques. Cependant, la majorité des cellules expriment les molécules du CMH II après la stimulation à l'IFN- $\gamma$  ou au TNF- $\alpha$  (13). En effet, certaines cellules comme les macrophages, doivent être stimulées par ces facteurs activateurs pour exprimer des niveaux significatifs de protéines du CMH II (14,15). D'autres types cellulaires, comme les lymphocytes B, synthétisent constitutivement les molécules du CMH II.



**Figure 1.2 Locus du complexe majeur d'histocompatibilité humain.** Les gènes du CMH II ainsi que les gènes du CMH I et III se situent sur le chromosome 6. Seuls les gènes exprimés sont indiqués. (Adapté de Klein, J. & Sato, A. *N. Engl. J. Med.* 2000) (12)

### 1.1.2 La structure des molécules du CMH de classe II

La structure des molécules du CMH II a pu être confirmée en 1993 par le groupe de Wiley suivant la cristallisation de la molécule HLA-DR1 (16). Trois ensembles de gènes sont codés dans la région du CMH II, soit DP, DQ et DR. Chacun de ces ensembles code pour deux glycoprotéines, la chaîne  $\beta$  très polymorphique (33-35 KDa) et la chaîne  $\alpha$  (25-30 KDa). Chacune des deux chaînes comporte une queue

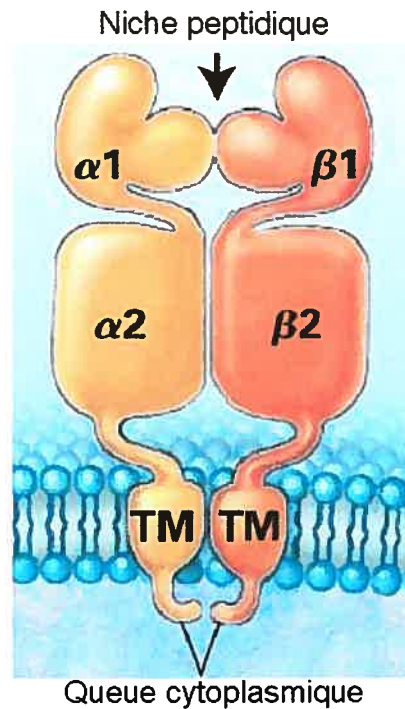
cytoplasmique, une région transmembranaire ainsi qu'une portion extracellulaire [Figure 1.3].

Chacune des deux chaînes est une protéine membranaire de type I et possède une séquence signal classique du côté N-terminal responsable de la translocation dans le réticulum endoplasmique (RE). Dans ce dernier, les chaînes s'associeront de façon non-covalente pour former des complexes hétérodimériques (17). Les molécules du CMH II ainsi formées comportent 4 domaines. Les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  (les plus près de la membrane) s'apparentent aux domaines constants des immunoglobulines et constituent le site de liaison avec la molécule CD4 des lymphocytes T auxiliaires (18).

Les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  (les plus éloignés de la membrane) s'associent pour former la région où se lieront les peptides antigéniques. Cette région, appelée niche peptidique, est reconnue par le récepteur des cellules T (TCR) [figure 1.4]. Des poches formées à l'intérieur de la niche peptidique contiennent les résidus polymorphiques variant parmi les nombreux allèles de molécules du CMH II (19,20). La liaison des peptides au creux des niches dépendra grandement de ces variations.

### **1.1.3 Les peptides présentés par les molécules du CMH de classe II**

Les peptides associés aux molécules du CMH II sont dérivés de protéines exogènes ayant accédé aux endosomes (discuté plus loin) par pinocytose, phagocytose ou via l'internalisation de récepteurs spécifiques ou non-spécifiques (21). Dans le système endosomique, des protéases dégradent les protéines en peptides d'une longueur variant entre 11 et 30 acides aminés. Le pH acide et les conditions

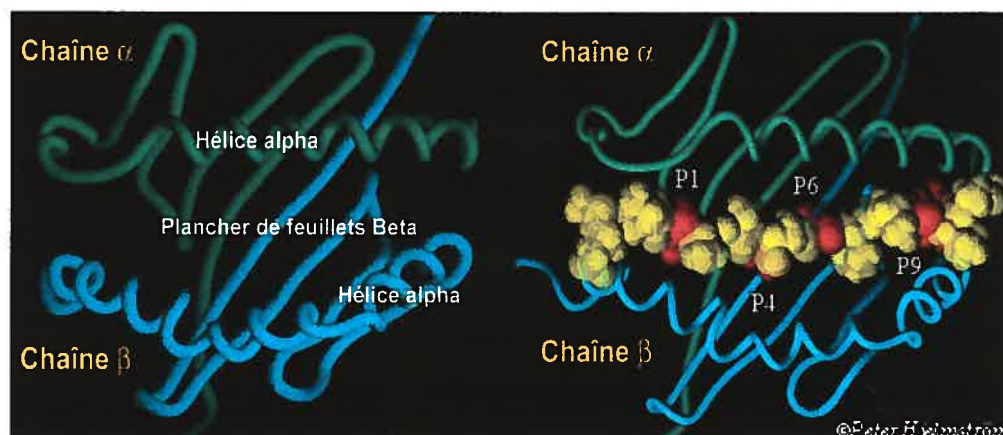


**Figure 1.3 Structure de la molécule du CMH de classe II.** Elle se compose des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  subdivisées en quatre domaines : le domaine de liaison avec le peptide ( $\alpha 1$  et  $\beta 1$ ), le domaine de la famille des immunoglobulines ( $\alpha 2$  et  $\beta 2$ ), le domaine transmembranaire et la queue cytoplasmique.

(Adapté de Klein, J. & Sato, A. *N. Engl. J. Med.* 2000) (12)

réductrices de ces compartiments contribuent à accentuer l'activité protéolytique des différentes protéases (22). Ces dernières varient d'un type de CPA à l'autre occasionnant la génération de répertoires d'épitopes variés (23). Les CPA pourront donc engendrer différents peptides selon le mode d'entrée des antigènes (Ag), les conditions d'acidité dans lesquelles ils se retrouvent et la variété des protéases cellulaires.





**Figure 1.4 Structure de la niche peptidique des molécules du CMH de classe II.** La niche est formée entre les domaines  $\beta 1$  et  $\alpha 1$  et comporte des poches polymorphiques (P1, P4, P6, P9) où s'encrent les peptides antigéniques. Le panneau de gauche montre la molécule du CMH II vide alors que celui de droite présente le peptide encré dans la niche.

(Adapté de <http://depts.washington.edu/rhwlab/dq/3structure.html>)

## 1.2 LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE DANS LE CONTEXTE DU CMH DE CLASSE II

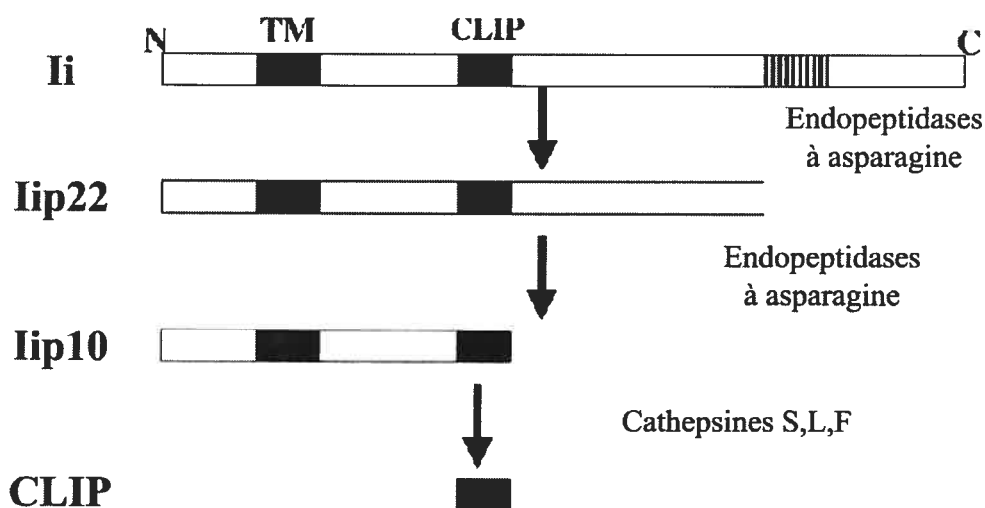
### 1.2.1 L'assemblage des molécules du CMH de classe II

Tel que mentionné plus haut, les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  constituant les molécules du CMH II s'associent dans le réticulum endoplasmique (RE) après leur biosynthèse. Les nouvelles molécules se lieront temporairement avec des polypeptides non codés par le locus du CMH mais requis pour leur assemblage et leur transport (24). Entre autre, la chaperonne moléculaire calnexine, qui réside dans le RE, assurera

l'assemblage des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  en assistant au bon repliement des protéines et en prévenant leur agrégation. La chaîne invariante, aussi appelée li ou CD74, joue aussi le rôle de chaperonne auprès des molécules du CMH II (25,26). Comme la calnexine, elle assure leur bon repliement en stabilisant les structures tertiaires et quaternaires et empêche leur agrégation. Des complexes nonamériques composés de trois molécules du CMH II ainsi que trois chaînes invariantes seront formés après l'assemblage des hétérodimères (27-29). La calnexine se liera à chacune des trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et li) pour assurer l'assemblage du nonamère (30,31). La chaîne li jouera aussi un rôle très important dans la prévention de la liaison prématurée de protéines naissantes ou de peptides présents dans le RE (32,33). La molécule peut s'exprimer en quatre isoformes chez l'humain grâce à une initiation de traduction alternative et un épissage différentiel. Ces formes sont nommées p33, qui prédomine, p35, p41 et p43 (34). La chaîne li rend possible l'assemblage des complexes nonamériques par sa région transmembranaire et son domaine de trimérisation luminal (35,36). Grâce à un motif de ciblage de type dileucine, la chaperonne permet aussi la sortie des complexes nonamériques du RE vers les compartiments endosomiques (37-39). D'ailleurs, chez les souris « knock-out » pour la chaîne li, les hétérodimères du CMH II sont peu exprimés à la surface cellulaire (40,41).

Une fois dans les compartiments, les molécules du CMH II sont libérées des chaînes invariantes et peuvent accéder à la surface cellulaire. La chaîne li est protéolysé en différents intermédiaires par plusieurs protéases (42-45). Les endopeptidases à asparagine (EPA), qui ciblent différents résidus asparagines du domaine luminal de la chaîne li, seraient impliquées dans les premières étapes de la protéolyse (46). Les cathepsines S, L et F ont la capacité de générer le produit final de

cette dégradation, un peptide protégé de la protéolyse dans la niche [figure 1.5] (34,38,43,47-49). Ce peptide, nommé CLIP (*Class II-associated invariant chain peptide*), comprend les résidus 81 à 104. Puisque les molécules du CMH II vides sont très instables aux pH acides des endosomes, CLIP aide à préserver la conformation de la niche peptidique (50-52).



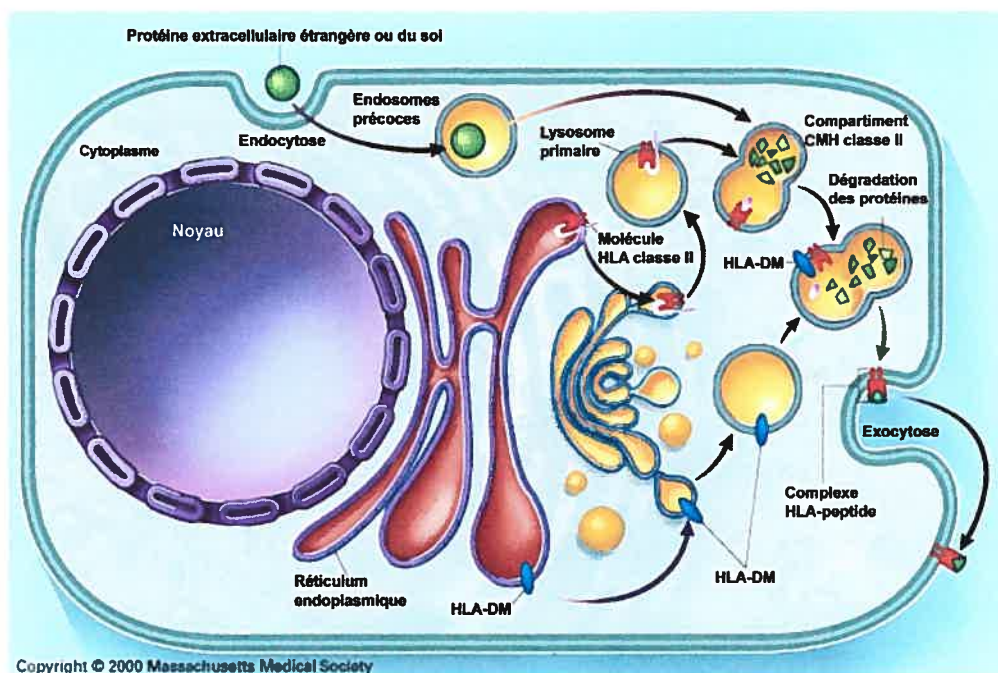
**Figure 1.5** Fragments de dégradation de la chaîne invariante (Ii).

Une fois que le complexe nonamérique composé de chaînes invariantes et de molécules du CMH II atteint les endosomes, la chaîne Ii est découpé de façon séquentielle par des protéases en produits intermédiaires (53). Le peptide CLIP, le résultat final de la dégradation de la chaîne Ii, reste lié dans la niche des molécules du CMH II.

(Adapté de [www.respiratory.research.com/.../1/3/170/figure/F1](http://www.respiratory.research.com/.../1/3/170/figure/F1))

### 1.2.2 Destination des molécules du CMH de classe II : les compartiments endosomiques ou MHC

Comme cité plus haut, une fois assemblées en hétérodimères puis en complexes nonamériques avec la chaîne Ii, les molécules du CMH II vont traverser l'appareil de Golgi et se diriger vers les compartiments endosomiques [Figure 1.6].



**Figure 1.6 Voie de la présentation antigénique par le CMH II.** Les molécules du CMH II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) et s'associent avec la chaîne Ii. Les complexes se rendent aux compartiments endosomiques où a lieu la dégradation des antigènes internalisés (en vert). La chaîne Ii y est aussi dégradée (en rose) et HLA-DM (en bleu) catalyse l'enlèvement du dernier produit intermédiaire nommé CLIP. Les peptides antigéniques sont chargés sur les molécules du CMH II (en rouge) et les complexes formés seront présentés à la surface cellulaire.

(Adapté de Klein, J. & Sato, A. *N. Engl. J. Med.* 2000) (12)

Des études de microscopie électronique et de fractionnement cellulaire ont permis de mettre à jour ces compartiments souvent appelés MIIC (*MHC class II Compartment*) (54). Ces derniers sont riches en molécules du CMH II et possèdent les propriétés de vésicules de transition entre les endosomes proprement dits et les lysosomes. C'est dans le système endosomique qu'a lieu la relâche du CLIP et le chargement des peptides antigénique. Un pH relativement acide est requis pour l'apprêtement des antigènes en peptides. Ces derniers seront donc disponibles dans les compartiments tardifs, puisque le pH interne s'acidifie lors de la maturation des endosomes en lysosomes.

### **1.2.3 L'apprêtement et la présentation de peptides**

Les protéines captées par une CPA (par exemple par endocytose) et internalisées dans les endosomes seront clivées par des protéases présentes dans ces compartiments. Ces protéases sont de type cathepsine et leupeptine. Les mêmes protéases serviront à la dégradation de Ii (cathepsine L et S) ne laissant que le CLIP dans la niche peptidique des molécules du CMH II (42-45). La relâche du CLIP est accomplie par une molécule spécialisée appelée HLA-DM. Elle permet aussi la liaison de peptide de forte affinité dans la niche des molécules du CMH II. Cet événement stabilise ces dernières qui pourront être délivrées à la surface cellulaire par une fusion membranaire des vésicules d'exocytose ayant préalablement fusionné avec les MIIC (54).

### 1.3 LA MOLÉCULE DU CMH DE CLASSE II NON CLASSIQUE HLA-DM

#### 1.3.1 Expression de HLA-DM

Certaines constatations ont vu le jour lors de diverses études sur la présentation antigénique par les molécules du CMH II, comme la démonstration de la liaison de peptides synthétiques sur des classes II purifiés sans autre molécule accessoire. Tout d'abord, il a été remarqué que les peptides s'associaient aux classes II plus rapidement *in vivo* que *in vitro* (55-58). Ensuite, il a été observé que les lignées cellulaires T2 et B-LCL, ayant une délétion sur le locus du CMH de classe II, ne pouvaient présenter des antigènes exogènes et que leurs molécules du CMH II ne présentaient à leur surface que des complexes de molécules du CMH II/CLIP (48,49,59-61). Enfin, des études de complémentation ont mené à la découverte des gènes affectés dans le locus, c'est-à-dire ceux des chaînes de la molécule HLA-DM (DM). Par ailleurs, la transfection des gènes de cette protéine dans les lignées cellulaires mutantes a rétabli la présentation antigénique par les classes II. On venait donc de découvrir que la principale activité de cette molécule était de libérer les molécules du CMH II du peptide CLIP, un événement primordial dans la présentation antigénique (62-65).

On dit de la molécule DM qu'elle est non classique puisque, contrairement aux molécules du CMH II classiques, elle est peu polymorphique et n'est pas exprimée à la surface des cellules (66-70). Toutes les cellules exprimant les classes II, c'est-à-dire les CPA, possèdent DM. Malgré un taux de transcription faible, les gènes DMA et DMb sont co-régulés avec les molécules classiques (70,71). La transcription des gènes de DM est commandée par CIITA et peut être induite par l'INF $\gamma$  (72,73).

### 1.3.2 La structure et la localisation de HLA-DM

La molécule DM possède une grande homologie structurale avec les molécules du CMH II classiques. La protéine est constituée d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  qui s'associent en hétérodimère dans le RE. À cause de la forte interaction entre les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$ , la niche est refermée et incapable de lier des peptides (70,74,75). La molécule DM est dirigée dans les compartiments endosomiques grâce à un signal de ciblage dépendant de la tyrosine (YTPL) situé dans la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  (66,76-78). Une mutation dans ce signal causera l'accumulation des molécules à la surface cellulaire. La molécule DM réside donc en permanence dans les endosomes, mais peut se retrouver de façon transitoire à la surface par la fusion des compartiments avec la membrane plasmique (68,79). Ces molécules s'associeraient alors avec des molécules du CMH II vides et permettraient le chargement de peptides à la surface cellulaire ou dans les compartiments de recyclage (80). Ces derniers feraient partie d'une voie alternative mais mineure de la présentation antigénique et qui n'impliquerait pas de molécules du CMH II nouvellement synthétisées (81-83). Les cellules dendritiques sont un bon exemple de CPA qui utilisent cette voie. En effet, elles exprimeraient des exoprotéases permettant un apprêtement antigénique en surface (84,85). Les peptides produits seraient alors directement présentés par les molécules du CMH II et la présence de DM préviendrait la liaison de peptides de faible affinité.

### 1.3.3 La fonction de HLA-DM

Puisque sa structure primaire est très similaire à celle des molécules du CMH II classiques, il a d'abord été proposé que DM pouvait enlever CLIP en s'y liant (67-69). Toutefois, des expériences de liaison directe

et de cristallisation de la protéine ont démontré qu'elle ne peut lier des peptides de façon stable (74,75). Des études utilisant des molécules du CMH II et DM purifiées ont révélé que ces dernières seules sont capables de faciliter la relâche de CLIP permettant par le fait même la liaison de peptides antigéniques. (62,64,86). Cependant, CLIP n'est pas le seul substrat de DM, car la molécule peut aussi promouvoir la relâche de peptides instables (87,88). Les molécules du CMH II vides s'avèrent très instables et, dans les conditions acides des compartiments endosomiques, seraient voués à la dégradation en absence de DM. La molécule agit donc comme chaperon sur les classes II en stabilisant leur structure lors de la relâche peptidique, maintenant leur habilité à lier d'autres peptides. Une interaction directe entre DM et les molécules du CMH II semble donc nécessaire pour changer la conformation de celles-ci afin d'affaiblir la liaison des peptides dans la niche (89). Ainsi, l'affinité d'un peptide pour une niche donnée pourrait déterminer s'il sera relâché ou retenu, occasionnant la présentation d'un répertoire antigénique très spécifique.

## **1.4 LA MOLÉCULE DU CMH DE CLASSE II NON CLASSIQUE HLA-DO**

### **1.4.1 L'expression de HLA-DO**

La molécule du CMH II non classique HLA-DO (DO) et son homologue H2-O chez la souris, ont été découvertes par hybridation croisée. En effet, c'est d'abord chez la souris qu'a été observée la grande homologie de H2-O $\beta$  avec les chaînes  $\beta$  des molécules classiques HLA-DR, HLA-DP et HLA-DQ (90,91). Plus tard, la chaîne  $\alpha$  a pu être cartographiée grâce à son association avec la chaîne  $\beta$  au niveau de la protéine. Tout comme DM, DO est une molécule du CMH II non classique puisqu'elle possède un polymorphisme limité et n'est pas



exprimé à la surface des cellules (90-93). Seuls quelques types cellulaires expriment cette molécule pour le moins mystérieuse (93-95). Les lymphocytes B sont connus pour l'exprimer de façon constitutive et la molécule semble d'ailleurs faire partie des caractéristiques propres à ce type cellulaire (96,97). Elle a aussi été observée dans les CPA de l'épithélium médullaire thymique, mais sa fonction dans ces cellules demeure obscure.

#### **1.4.2 La structure et la localisation de HLA-DO**

Tout comme les molécules du CMH II classiques, la molécule DO se compose de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qui s'assemblent pour former un hétérodimère. La transcription de la chaîne  $\alpha$  est similaire à celles des autres gènes du CMH II, c'est-à-dire sous le contrôle de CIITA mais avec un taux d'expression dix fois moins important (94). Toutefois, l'expression de la chaîne  $\beta$  semble indépendante de CIITA, ce facteur n'étant pas recruté efficacement au promoteur du gène (72,94,98-100). L'INF- $\gamma$  ne montre pas non plus d'influence sur l'expression de la chaîne DO $\beta$  (93).

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la molécule DO s'assemblent dans le RE. DO n'a pas encore été cristallisé, car la molécule est très instable en absence de la molécule DM. Les hétérodimères doivent donc s'associer à DM pour être stabilisée et quitter le RE (101). Le groupe de Karlsson a d'ailleurs observé que la majorité des molécules DM sont liées à DO et que dans les souris qui n'expriment pas H2-M, les niveaux de molécules H2-O diminuent et très peu peuvent sortir du RE. Les complexes DO-DM sont emmenés dans les compartiments endosomiques grâce à un signal de ciblage (motif tyrosine) contenu dans la chaîne  $\beta$  de DM (94,101-103). L'association entre DO et DM semble très stable puisque

les complexes survivent dans le système lysosomal (96,101). La molécule DO réside donc aussi dans les endosomes et n'est pratiquement pas exprimée à la surface cellulaire. Il est intéressant de noter que DO contient aussi un motif de ciblage aux endosomes rendant probable le transport des complexes DO-DM vers des compartiments différents de ceux où se retrouvent les molécules DM libres (102-104).

### 1.4.3 La fonction de HLA-DO

Puisque la molécule DO est toujours retrouvée en association avec la molécule DM, la fonction de régulateur de DO sur DM était à prévoir. À partir des premières études *in vitro*, il avait été conclu que DO modulait négativement l'activité de DM (105-107). En effet, on avait observé que les complexes DO-DM diminuait le chargement de peptides sur les molécules DR. Par ailleurs, il a aussi été constaté que la surexpression de DO dans des lignées cellulaires augmentait considérablement l'expression des molécules du CMH II associées au CLIP à la surface cellulaire (106,107). D'autres études utilisant des souris *knock-out* pour H2-O ont démontré que la protéine occasionnait des changements dans le répertoire peptidique. (105,107-109).

La molécule DO seule n'a pas d'effet mesurable sur l'échange de peptides et son activité sur DM semble dépendante du pH. L'effet inhibiteur se manifesterait à pH élevé (>5.5) retrouvé dans les endosomes précoces, alors que cette activité serait de beaucoup diminuée à pH plus acide (endosomes tardifs et des lysosomes) (105,109-111). Ainsi, la molécule DO influencerait indirectement la nature des peptides chargés sur les molécules du CMH II en se liant à la molécule DM et en limitant son action. La variété du répertoire des peptides présentés à la surface cellulaire sera donc dépendante de la

présence ou l'absence de DO. Par des études de présentation antigénique chez des souris déficientes pour H2-O, il a été conclu que H2-O/HLA-DO préviendrait la présentation d'antigènes (Ag) internalisés de façon non spécifique dans les endosomes précoces par endocytose en phase fluide (pinocytose) ou via des récepteurs de faible affinité (109). La molécule favoriserait donc la présentation d'Ag internalisés spécifiquement dans les endosomes tardifs et les lysosomes puisque les immunoglobulines membranaires (mIg) ou BCR (récepteur des cellules B) liés à un Ag de haute affinité sont plus résistants à la dégradation protéolytique dans des conditions de pH élevé (pH retrouvé dans les endosomes précoces). Une de nos études a démontré que l'expression de DO est réduite dans les lymphocytes B primaires stimulés avec une combinaison de CD40L et d'IL-4 (2). Cette observation corrèle avec la capacité de ces cellules B non spécifiques à présenter des antigènes tumoraux aux cellules T, suggérant par le fait même que DO influence le répertoire peptidique. Des analyses réalisées par d'autres groupes ont révélé que les niveaux protéiques de DO sont modulés durant les étapes de différenciation des lymphocytes B (98,112,113). Ainsi, pour générer des cellules B mémoires très spécifiques, les cellules B naïves doivent d'abord rencontrer l'antigène dans les zones riches en cellules T des organes lymphoïdes (114). Les cellules B sont alors activées par des cellules T spécifiques à l'antigène et entrent dans les centres germinatifs (CG) pour devenir des centroblastes qui prolifèrent et mutent leur BCR. Les centroblastes se différencient ensuite en centrocytes qui passent par une sélection positive. Celle-ci requière la reconnaissance et la capture de l'antigène sur les cellules dendritiques folliculaires et la présentation des peptides antigéniques générés aux cellules T des CG. La molécule DO est exprimée à de hauts niveaux dans les cellules B naïves, mais lors de leur entrée dans les CG, l'expression de la protéine chute drastiquement

pour remonter plus tard quand les cellules sortent des compartiments (113). Ceci conférerait aux lymphocytes B activés une capacité de présentation accrue favorisant les interactions avec les lymphocytes T responsables de leur maturation et différenciation.

En résumé, la molécule DO aurait pour fonction d'augmenter la spécificité de la présentation antigénique lors des premières étapes de leur activation. Ceci concorderait avec les fonctions très spécialisées des cellules B, la sous-population lymphocytaire exprimant cette molécule. Par ailleurs, on sait maintenant que le rôle de DO s'avère plus spécialisé qu'on ne le croyait. En effet, il a été découvert que H2-O chez la souris pouvait moduler de façon négative, positive ou neutre la présentation des antigènes internalisés spécifiquement dans la cellule par le BCR. Étonnement, certains épitopes exigeraient même la présence de la molécule pour être présentés (115). La comparaison entre des lignées cellulaires transfectées pour DO et les cellules non-transfectées a démontré qu'une fraction considérable du répertoire peptidique était spécifique aux cellules DO+ (105). De plus, le rôle de H2-O semble varier en fonction du fond génétique (108). Toutefois, le rôle exact de DO demande à être caractérisé plus en détails.

## **1.5 LES CELLULES DENDRITIQUES**

Comme il a déjà été mentionné plus haut, les CPA sont les spécialistes de la présentation antigénique par le CMH II, bien qu'elles présentent aussi par le CMH I. Chaque type de CPA possède toutefois des attributs propres et souvent uniques. Dans les prochaines lignes, il sera question d'une des plus importantes familles de CPA, soit les cellules dendritiques.

### 1.5.1 L'origine des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) sont continuellement produites à partir de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Dans cette dernière, les précurseurs  $CD34^+$  se différencient en progéniteurs de la lignée lymphoïde (PLL) ou de la lignée myéloïde (PLM). Les PLL peuvent donner lieu à des précurseurs de cellules dendritiques  $CD14^- CD11c^- IL-3R\alpha$  (aussi appelés pDC2, cellules productrices d'IFN- $\alpha$  ou monocytes plasmacytoïdes) capables de se différencier en cellules dendritiques immatures (CDi) sous l'influence de l'IL-3 (116). La lignée myéloïde, beaucoup mieux caractérisée, se différencie en deux sous-classes de précurseurs circulant dans le sang : les monocytes  $CD14^+ CD11^+ CD1a^-$  ou les cellules  $CD14^- CD11c^+ CD1^+$  (117). Ces deux types cellulaires se différencient à leur tour sous l'effet de différentes cytokines. Ainsi, les monocytes deviennent des cellules dendritiques interstitielles (CDint) immatures en présence de GM-CSF et d'IL4 (118) ou des macrophages en présence de M-CSF. Les cellules  $CD14^- CD11c^+ CD1^+$  quant à elles deviennent des cellules dendritiques de Langerhans (CDL) sous l'effet de GM-CSF, d'IL-4 et de TGF $\beta$  ou encore des macrophages de Langerhans sous l'effet de M-CSF. Le système de différenciation des cellules  $CD34^+$  est donc d'une grande plasticité, car sous l'influence de différentes cytokines, un même précurseur peut se différencier en plusieurs types cellulaires distincts. Toutes ces cellules pourront devenir matures en présence de certains facteurs comme le CD40L par exemple ou des agents dérivés de pathogènes comme les lipopolysaccharides (LPS).

Les deux types de CD de la lignée myéloïde, les CDL et les CDint, possèdent des caractéristiques propres les plaçant dans des catégories distinctes de cellules immunitaires. Un grand rôle les unit toutefois, celui de sentinelles surveillant la présence d'Ag ou de dommages dans les

tissus périphériques ayant un contact avec l'extérieur (les muqueuses et la peau). Ces types de cellules sont également capables de stimuler la prolifération des cellules T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  naïves, mais seules les CDint peuvent induire la différenciation des cellules B naïves en cellules sécrétrices d'anticorps (119). Alors que les deux sous-classes expriment l'IL-12, l'exclusivité de l'expression de l'IL-10 revient aux CDint (120). Ces dernières montrent aussi une efficacité de capture antigénique dix fois plus élevée que les CDL. Une des caractéristiques qui permet de détecter les CDL facilement est la présence de granules de Birbeck qui joueraient un rôle dans le transport intracellulaire et l'apprêtement antigénique (121,122).

Les sections subséquentes porteront particulièrement sur les CDint qui sont les plus communément utilisées et dont les caractéristiques sont les mieux définies (118,123).

### **1.5.2 Le cycle de vie des cellules dendritiques**

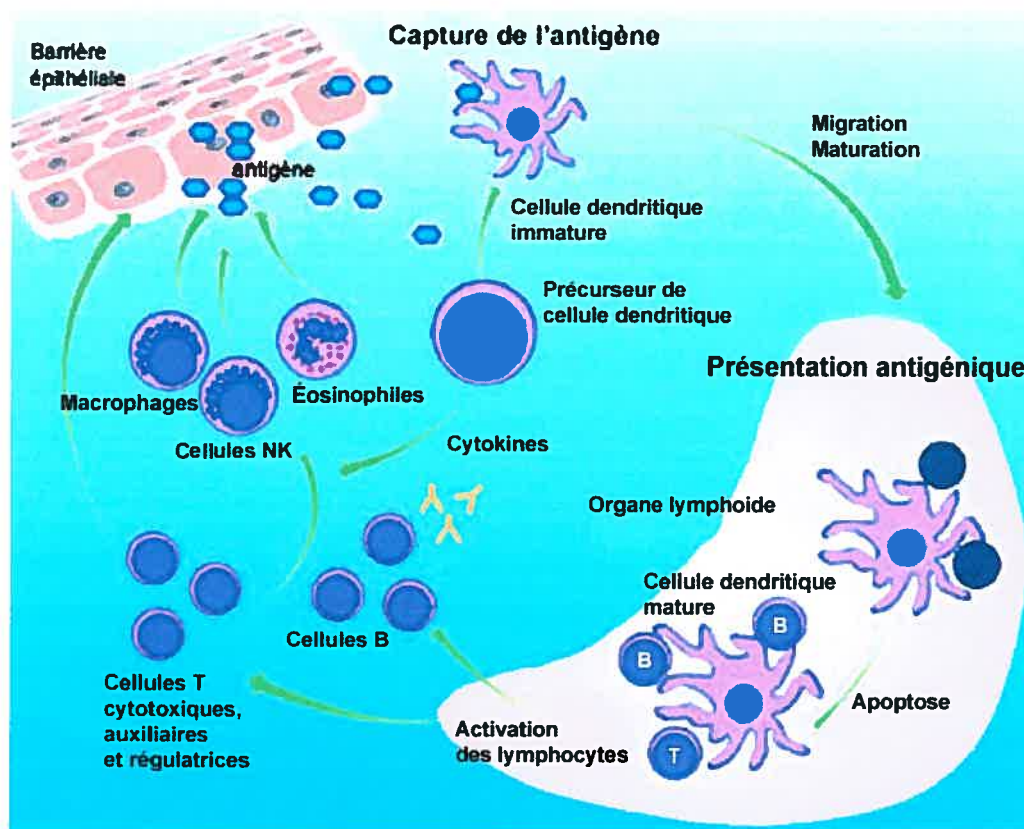
Une caractéristique importante des CD est leur grande mobilité durant leurs étapes de maturation, le tout dans le but ultime de présenter les peptides d'un Ag donné aux cellules T et ainsi initier une réponse immunitaire. Ces déplacements requièrent la présence de chémokines produites dans les tissus par des cellules endothéliales, épithéliales et des leukocytes en réponse à divers stimuli inflammatoires (124). Les CD répondent à ces agents chimotactiques grâce à des récepteurs exprimés à leur surface (125). L'expression de ces récepteurs est modulée en fonction du stade de maturation des CD suivant l'endroit où elles devront migrer.

Ainsi, les précurseurs de CD générés dans la moelle osseuse vont migrer par le sang vers les tissus périphériques (non-lymphoïdes) où ils résident et surveillent leur environnement [Figure 1.7]. À ce stade, les CD sont immatures et voyagent vers les sites inflammatoires (site d'endommagement de tissus ou d'entrée d'un pathogène) où elles capturent très efficacement les Ag. Ces derniers peuvent être internalisés de plusieurs façons dont la pinocytose en phase fluide, l'endocytose récepteur-dépendante (récepteurs lectine de type C ou récepteurs Fc $\gamma$ ) et la phagocytose (126). Plus les CD approchent du site de production de chémokines, plus elles sont exposées à des concentrations grandissantes de cytokines proinflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et des produits dérivés de pathogènes. En réponse à ces signaux de danger, les CD répondront aux chémokines les attirant aux organes lymphoïdes secondaires où se trouvent les cellules T (127,128). Cette migration occasionne de grands changements dans les CD qui passeront du stade de capture d'Ag (immatures) à celui de présentation de ces Ag (matures). La maturation correspond à des transformations irréversibles importantes telles que la perte des récepteurs d'endocytose et de phagocytose, l'augmentation d'expression de molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86), des changements morphologiques et des modifications dans les compartiments endosomiques (129,130).

### **1.5.3 La présentation antigénique par les cellules dendritiques**

L'apprêtement antigénique dans les cellules dendritiques peut se faire par deux grandes voies dites exogène (endosomique) et endogène (utilisant le complexe du protéasome). Les molécules du CMH I présenteront surtout les peptides dérivés d'Ag de la voie endogène, c'est-à-dire provenant du cytoplasme et dégradés par le protéasome.

Les peptides sont transloqués dans le RE et chargés sur les molécules de classe I. Toutefois, il est connu depuis maintenant une vingtaine d'années que les CD ont la capacité de présenter sur les molécules du CMH I des peptides provenant d'Ag exogènes (131,132).



**Figure 1.7 Cycle de vie des cellules dendritiques.** Les précurseurs provenant de la moelle osseuse deviennent des cellules dendritiques immatures (CDi) qui surveillent les tissus périphériques pour la présence d'antigènes (Ag). À leur contact, les CD mûrissent et migrent aux organes lymphoïdes secondaires pour les présenter aux cellules T CD4<sup>+</sup>. Celles-ci activeront les effecteurs responsables de la destruction des pathogènes.

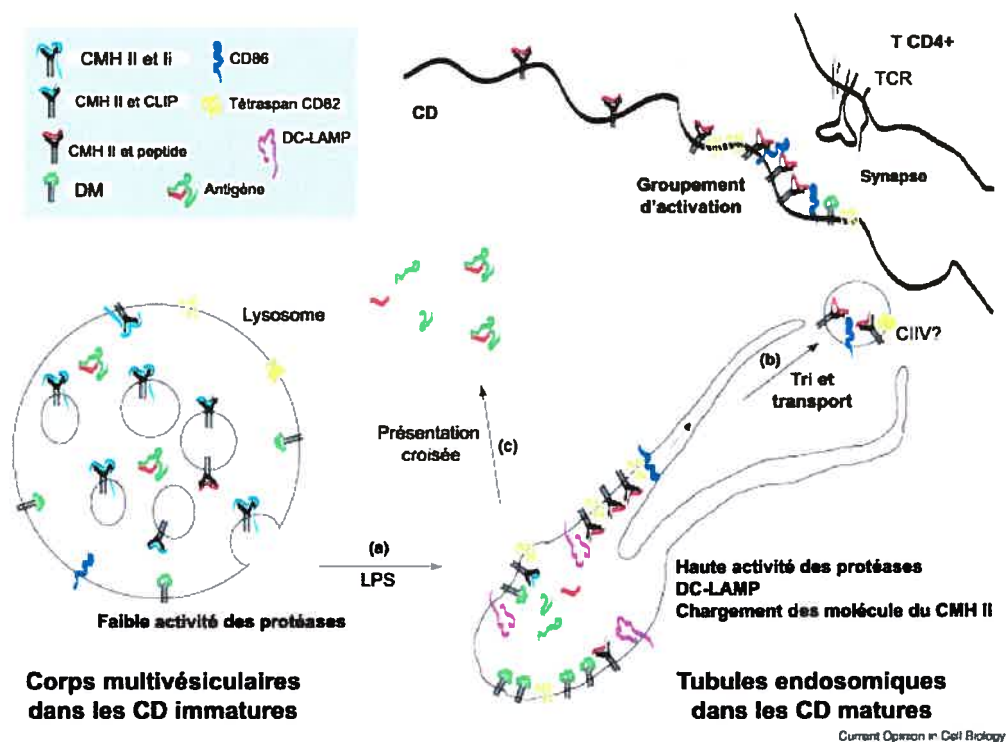
(Adapté de [www.sri.com/biosciences/infect/basic.html](http://www.sri.com/biosciences/infect/basic.html))



Cette propriété unique aux CD et aux macrophages est nommée la « présentation croisée ». Les Ag phagocytés fuient le phagosome vers le cytoplasme et sont dégradés par le protéasome. Il a été démontré que le phagosome fusionne avec le RE, ce qui lui fournit les protéines nécessaires à la translocation (TAP), le chargement (tapasine, calreticuline et Erp57) et la présentation de peptides antigéniques (molécules du CMH I) (133-136). Les peptides résultant de la dégradation protéosomale sont donc retransloqués dans le phagosome pour être chargés sur les molécules de classe I. Ainsi, la présentation croisée constitue un mécanisme complémentaire qui contribue à l'élaboration de la réponse immunitaire cytotoxique par les cellules T CD8+

Le processus de présentation antigénique par les molécules du CMH II, déjà décrit aux sections 1.2.1 à 1.2.3, est teinté de quelques propriétés uniques dans le cas des CD [Figure 1.8] (137,138). Les CD synthétisent constamment des molécules du CMH II *de novo* qui s'accumulent dans les compartiments endosomiques tardifs et lysosomiques (MIIC) où se trouvent déjà les peptides dérivés des Ag exogènes internalisés. Des complexes molécules du CMH II-peptides peuvent se former, mais ils sont retenus dans les compartiments. S'ils réussissent à atteindre la surface, ils sont rapidement réinternalisés (139-141). Lorsque les CD sont stimulées, la maturation engendrée occasionne de profonds changements morphologiques des MIIC (142-144). En effet, par des observations en microscopie électronique et par vidéo-microscopie, il a été découvert que l'activation provoquait la génération, à partir de la membrane des compartiments, de tubules fusionnant avec la membrane plasmique. Ceci permettrait de délivrer les complexes molécule du CMH II-peptide déjà formés à la surface cellulaire. De plus, l'expression même des molécules du CMH II est freinée lors de la maturation des

CD. Il est déjà connu que CIITA (mentionné dans la section 1.1.1) est un des facteurs clés dans la régulation de l'expression des molécules du CMH II. Une baisse dans l'expression de ce facteur serait la cause de l'arrêt de synthèse *de novo* des classes II (146). La molécule DM et la chaîne li (décrits dans les sections 1.2.1 et 1.3), faisant partie du processus de chargement des peptides antigéniques, sont aussi régulés



**Figure 1.8 Présentation antigénique par le CMH II dans les cellules dendritiques.** Celles-ci accumulent les molécules du CMH II dans les MHC où se trouvent les peptides antigéniques. Lors de la maturation des CD, des tubules se forment pour délivrer les complexes molécules du CMH II/peptide à la surface cellulaire pour la présentation aux cellules T.

(Adapté de Gatti, E. and Pierre, P. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003) (145)

à la baisse lors de l'activation des CD. Toutefois, les CD en maturation stabilisent à la membrane plasmique toutes les molécules du CMH II pré-synthétisée rendant possible une présentation optimale des peptides antigéniques.

Tel que mentionné, la molécule DO est exprimée principalement dans les cellules B et n'est donc pas retrouvée dans les CD. En fait, seule la chaîne  $\alpha$  y est exprimée en petites quantités et est rapidement dégradée faute de pouvoir se lier à la chaîne  $\beta$  (94,95,98,140,147). Ainsi, après tant de bouleversements, les CD en maturation jouent maintenant le rôle de CPA professionnelles et sont prêtes à rencontrer les cellules T auxiliaires dans les organes lymphoïdes secondaires.

Les cellules T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  reconnaissent respectivement les peptides présentés sur les molécules du CMH II et de classe I (signal 1). Des molécules accessoires (signal 2) sont également nécessaires pour assurer leur division et leur différenciation en cellules effectrices. En absence de costimulation par ces molécules accessoires (incluant CD80, CD86 et CD40), les cellules T deviennent anergiques ou apoptotiques. La sécrétion ou la non-sécrétion de certains facteurs, surtout l'IL12 (signal 3), joue un rôle dans la différenciation finale des cellules T en effecteurs de type 1 (Th1) ou de type 2 (Th2) (148). Les cellules Th1 aident à la création d'une réponse cellulaire en sécrétant l'IL2, l'IL3, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\beta$  qui sont responsables de l'activation des lymphocytes B, T et des cellules NK.

Les CD sont les seules CPA capables d'activer des cellules T  $CD4^+$  naïves, phénomène qui a été observé par des expériences chez des souris dans lesquelles on injectait des CD préalablement chargées avec des Ag solubles (149). La réponse des cellules T auxiliaires

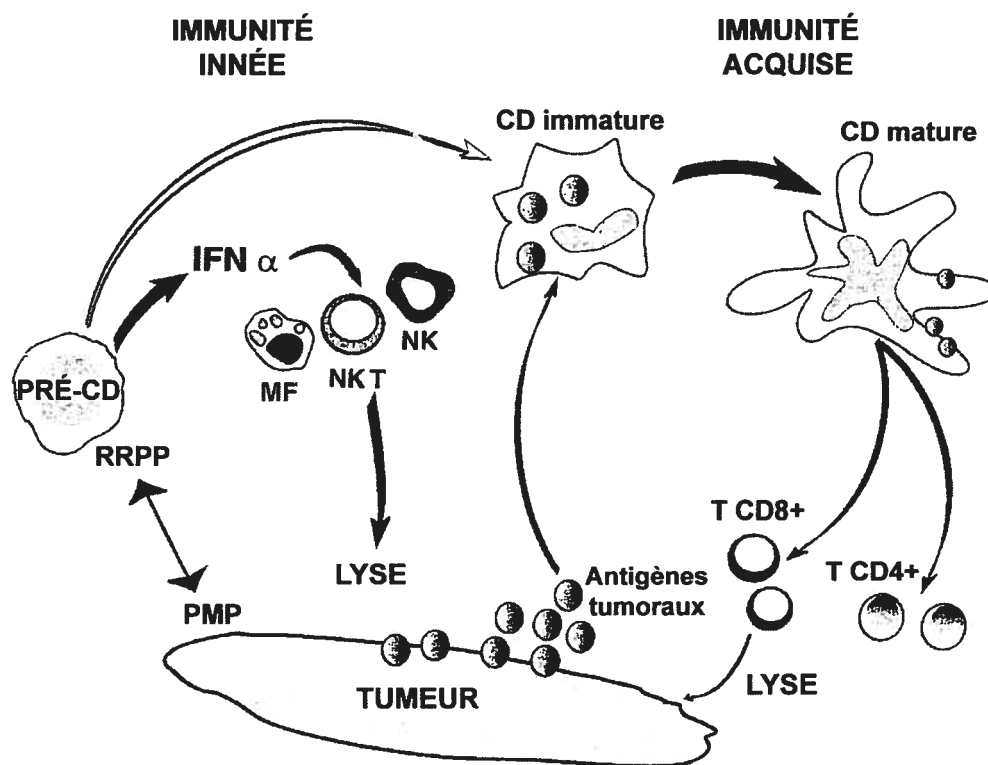
occasionnée était spécifique à l'Ag suggérant une rencontre directe avec les CD chargées.

#### **1.5.4 L'immunité anti-tumorale et l'immunothérapie utilisant les cellules dendritiques transduites avec l'adénovirus**

Les CD jouent un rôle régulateur central dans l'immunité anti-tumorale en faisant le pont entre le système immunitaire inné et acquis [figure 1.9]. La réponse innée débute par la reconnaissance de la tumeur par les précurseurs de CD qui vont activer les cellules effectrices, comme les cellules NK (*natural killers*), à tuer directement les cellules malades. Les CDi passent à la réponse acquise en capturant et présentant les antigènes associés aux tumeurs (AAT), ce qui occasionne la sélection et l'activation de cellules T spécifiques à ces AAT ainsi que de cellules non-spécifiques comme les macrophages. Les tumeurs qui s'implantent de façon durable sont capables de déjouer toutes les étapes de cette surveillance immunitaire (150,151). Par exemple, la relâche de certaines cytokines par les tumeurs peut prévenir la différenciation ou même la fonction des CPA (152). De plus, les cellules tumorales ne génèrent habituellement pas de signaux de danger comme le font les pathogènes, empêchant les CD ayant internalisé des Ag tumoraux de maturer. Au contact de ces CD, les cellules T deviennent tolérantes (c'est-à-dire ne reconnaissant plus comme étranger) faute de recevoir le signal d'activation (signal 2) et ne peuvent détruire la tumeur (154).

Toutefois, la grande aptitude qu'ont les CD à induire des réponses immunitaires primaires en font des candidates de choix pour l'élaboration de protocoles de vaccination contre les cellules cancéreuses (155,156). Plusieurs approches existent déjà dont le chargement direct des AAT sur des CD *in vitro* qui sont ensuite

réinjectées chez un patient cancéreux. Cette stratégie peut mener à l'induction de réponses immunitaires protectrices ou même au rejet de tumeurs établies. Différents systèmes ont été élaborés pour charger les

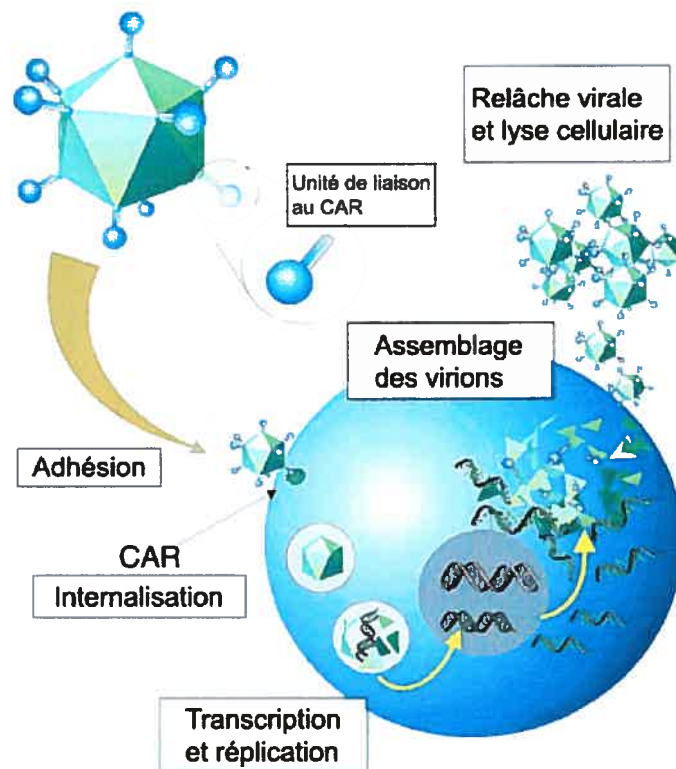


**Figure 1.9 Réponse anti-tumorale initiée par les cellules dendritiques.** Les précurseurs de CD reconnaissent des patrons moléculaires pathogéniques (PMP) provenant de la tumeur par des récepteurs de reconnaissance de patrons pathogéniques (RRPP). Une réaction innée est alors déclenchée et implique les macrophages et les cellules NK. Des antigènes tumoraux sont aussi reconnus par les CD immatures qui les présentent aux cellules T CD4+ pour monter une réponse anti-tumorale spécifique.

(Adapté de Banchereau, J. & al. *Annu. Rev. Immunol.* 2000) (153)

AAT comme l'utilisation directe de peptides tumoraux, des lysats complets de cellules cancéreuses, des fusions entre CD et cellules tumorales, le transfert d'ADN codant pour des Ag tumoraux à l'aide de vecteurs viraux et bien d'autres (150,151,155). Cependant, la plupart des types de CD sont réfractaires aux méthodes de transfections conventionnelles. Par exemple, les cellules dendritiques dérivées de monocytes présentent un taux de transfection presque nul par la méthode d'électroporation (157). Pour contrecarrer la piètre efficacité des techniques de transfection courantes, le recours à la transduction à l'aide de vecteurs adénoviraux reste le meilleur moyen pour le transfert de gènes. Par ailleurs, outre un certain effet controversé sur la maturation, l'adénovirus ne perturberait en rien les fonctions des CD (158,159). Dans cet optique, l'utilisation de l'adénovirus s'avère très efficace pour introduire des gènes à l'intérieur des CD (160). D'abord, le virus est ubiquitaire puisqu'il existe un très grand nombre de sérotypes ayant été isolés dans une large variété d'espèces (une centaine dont 43 chez l'humain). D'ailleurs, l'adénovirus est peu pathogène pour l'humain et la plupart des adultes ont été exposés aux sérotypes les plus utilisés en immunothérapie génique, soit les sérotypes 2 et 5. Les vecteurs adénoviraux sont capables d'infecter un large spectre de cellules, dont les cellules qui ne prolifèrent pas (non-divisibles), et ce avec un taux élevé de transfert de gènes comparativement aux autres vecteurs disponibles (rétrovirus par exemple). De plus, de larges segments d'ADN peuvent être clonés dans ces vecteurs qui sont faciles à manipuler par les méthodes de recombinaison conventionnelles. Finalement, le génome viral ne se réarrange pas fréquemment faisant en sorte que les gènes insérés sont maintenus au travers des cycles de réplication du virus (161). L'adénovirus est un virus non-enveloppé à double-brins d'ADN de 36 kb dont certaines régions peuvent être substituées pour l'insertion de l'ADN étranger. La délétion de la région

E1 empêche le virus de se répliquer. L'adénovirus n'intègre pas le génome de la cellule hôte, ne dérangeant donc pas les processus cellulaires vitaux. Par contre, l'expression des protéines est temporaire limitant l'étendue des thérapies. Le cycle infectieux de l'adénovirus débute par l'adhésion du virus à l'aide d'une fibre trimérique qui se lie à un récepteur à la surface des cellules permissives [Figure 1.10].



**Figure 1.10 Cycle viral de l'adénovirus.** Le virus à ADN double-brins entre dans les cellules grâce au récepteur CAR. Après la décapsidation, le génome viral, qui n'intègre pas le génome cellulaire, est transcrit et répliqué. Les virions sont ensuite assemblés et relâchés lors de la lyse cellulaire occasionnée par la multiplication du virus.

(Adapté de Vorburger S.A. and Hunt K.K. *Oncologist*. 2002) (161)

Ce récepteur, appelé CAR pour *Coxsackie B and adenovirus receptor* (162), n'est pas exprimé aux mêmes niveaux chez tous les types cellulaires. Par exemple, il est déjà connu que les CD laissent difficilement entrer le virus puisqu'elles n'expriment pas fortement le récepteur CAR. Une transduction efficace ne peut donc se faire qu'à de hautes multiplicités d'infection (MOI) (163,164).

## **1.6 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL**

Dans la section précédente, nous avons survolé la présentation antigénique dans le cadre du CMH de classe II. Nous avons dépeint le rôle des molécules non-classiques, en particulier HLA-DO, ainsi que les caractéristiques et fonctions des cellules dendritiques. En plus d'approfondir la caractérisation de DO, nous cherchons maintenant à connaître son rôle et son effet sur la présentation antigénique par les CD humaines. Plus spécifiquement, nous voulons savoir si la molécule agit de la même façon que chez les lymphocytes B, c'est à dire si elle se retrouve complexée à DM dans les mêmes compartiments et si elle garde ses propriétés immunorégulatrices. Si tel est le cas, nous pouvons spéculer que DO aura un effet marqué sur le répertoire peptidique des CD, tout comme chez les lymphocytes B. Cette variation pourrait faire apparaître un nouveau répertoire antigénique dont l'importance dans l'élaboration d'immunothérapie sera discutée.



## **CHAPITRE 2; ARTICLE**

## **HLA-DO TRANSDUIT DANS LES CELLULES DENDRITIQUES DÉRIVÉES DE MONOCYTES MODULE LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE PAR LE CMH DE CLASSE II.**

Angélique Bellemare-Pelletier, Jessy Tremblay, Sylvie Beaulieu,  
Mohamed-Rachid Boulassel, Jean-Pierre Routy, Bernard Massie,  
Réjean Lapointe et Jacques Thibodeau

### **Contribution des auteurs**

J'ai produit tous les résultats présentés, sauf ceux concernant les RT-PCR qui ont été réalisés par Jessy Tremblay. J'ai toutefois généré les cellules dendritiques immatures et matures utilisées pour l'extraction d'ARNm. Sylvie Beaulieu m'a grandement aidé dans l'apprentissage de la purification et de la culture des cellules dendritiques. Mohamed-Rachid Boulassel et Jean-Pierre Routy ont fourni leur assistance pour les prélèvements de sang et les leukaphérèses. Bernard Massie a contribué par son expertise concernant l'adénovirus et a donné les plasmides nécessaires à la construction des virus recombinants. Réjean Lapointe a fourni le clone de cellule T restreint à HLA-DR $\beta$ 1\*0701 spécifique pour un épitope de gp100 et les lysats de cellules cancéreuses. J'ai collaboré avec Jacques Thibodeau dans la rédaction de cet article.

(Soumis dans *The Journal of Immunology*)

## RÉSUMÉ

Les cellules présentatrices d'antigènes expriment des chaperonnes impliquées dans le chargement de peptides antigéniques sur les molécules du CMH II. HLA-DO est une molécule du CMH II non-classique presque exclusivement exprimée dans les lymphocytes B naïfs matures. Cette molécule régule la fonction de HLA-DM dans le système endosomique et module la présentation de peptides spécifiques de façon positive ou négative. Étant donné ses propriétés immunorégulatrices, nous avons investigué l'activité de HLA-DO transduit dans les cellules dendritiques. Ces cellules démontrent des caractéristiques particulières concernant le transport intracellulaire d'antigènes et de molécules du CMH II. Les cellules dendritiques immatures ont été dérivées de monocytes provenant de sang traités avec de l'IL4 et du GM-CSF. Ces cellules DO $\alpha^+$  ont été transduites avec un vecteur adénoviral codant pour la chaîne DO $\beta$  seule ou pour les deux chaînes DO $\alpha$  et DO $\beta$ . Après 48h en présence de LPS, DO était retrouvé dans les endosomes DM $^+$ , CD63 $^+$  par microscopie à fluorescence. L'augmentation de la quantité de molécules du CMH II associées à CLIP à la membrane plasmique est en accord avec le rôle de HLA-DO comme inhibiteur de HLA-DM dans les compartiments endocytiques précoces. L'expression de HLA-DO n'a pas affecté la capacité des cellules dendritiques à activer les cellules T dans les réactions lymphocytaires mixtes (MLR). Finalement, la présentation de l'antigène exogène gp100 à un clone de cellule T spécifique était diminuée en présence de HLA-DO. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les molécules HLA-DO transduites sont fonctionnelles dans les cellules dendritiques tout comme dans les autres cellules présentatrices d'antigènes évoquant la possibilité d'utiliser cette chaperonne à des fins immunothérapeutiques.

## **HLA-DO TRANSDUCED IN MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS MODULATES MHC CLASS II ANTIGEN PRESENTATION**

Angélique Bellemare-Pelletier\*, Jessy Tremblay\*, Sylvie Beaulieu<sup>§</sup>, Mohamed-Rachid Boulassel<sup>£</sup>, Jean-Pierre Routy<sup>£</sup>, Bernard Massie<sup>‡</sup>, Réjean Lapointe<sup>†</sup> et Jacques Thibodeau<sup>\*¶</sup>

\* Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>§</sup> Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Saint-Luc, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>£</sup> Division of Hematology and Immunodeficiency Service, Royal Victoria Hospital, McGill University Health Center, Montréal, Québec, Canada

<sup>‡</sup> Institut de Recherche en Biotechnologie, Montréal, Québec, Canada

<sup>†</sup> Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Notre-Dame, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

**Running title:** HLA-DO transduction in dendritic cells

**¶Corresponding author:** Jacques Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie Moléculaire Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

**Tel :** (514) 343-6279 ; **Fax :** (514) 343-5701

**e-mail :** Jacques.Thibodeau@umontreal.ca

**FOOTNOTE**

This work was supported by grants from the Société de Recherche sur le Cancer Inc. (JT), the Canadian Institute of Health Research (CIHR) (JT and RL) and Valorisation Recherche Québec (JT, MRB ad JPR). This is supported also by the Réseau SIDA et Maladies Infectieuses du Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). JT is the recipient of a CIHR scholarship. JPR and RL are scientific scholars receiving support from FRSQ.

## SUMMARY

Antigen presenting cells express chaperones involved in the loading of antigenic peptides on MHC class II molecules. HLA-DO is a non-classical class II molecule almost exclusively expressed in mature naïve B lymphocytes. It regulates the function of HLA-DM in the endocytic pathway and modulates either positively or negatively the presentation of specific peptides. Given its immunomodulatory properties, we have investigated the activity of HLA-DO upon transduction into dendritic cells, which display peculiar characteristics regarding intracellular transport of antigens and of class II molecules. Immature dendritic cells were obtained using blood-derived monocytes treated with IL-4 and GM-CSF. These DO $\alpha^+$  cells were transduced with an adenoviral vector coding for DO $\beta$  alone or both the DO $\alpha$  and DO $\beta$  chains. After 48h in the presence of LPS, DO was found by immunofluorescence microscopy in DM $^+$ , CD63 $^+$  endosomes. At the plasma membrane, the increased amount of class II molecules associated with the CLIP peptide suggests a role of HLA-DO in the inhibition of HLA-DM in early endocytic compartments. HLA-DO expression did not affect the capacity of DCs to activate T cells in a mixed lymphocyte reaction. Finally, presentation of the exogenous gp100 antigen to a specific T cell clone was diminished by the presence of DO. Taken together, these results suggest that transduced DO molecules are functional in DCs just like in other APCs, evoking the possible use of this chaperone for immunotherapeutic purposes.

## INTRODUCTION

A key event in specific immune responses is the recognition by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of antigen presenting cells (APC) bearing foreign peptides in the groove of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules (1,2). Class II  $\alpha$  and  $\beta$  chains assemble in the endoplasmic reticulum and form a complex with the invariant chain (Ii) before being targeted into the endocytic pathway (3). In endosomes, Ii is degraded until only a class II-associated Ii fragment (CLIP) remains in the peptide binding groove (4). HLA-DM (DM) is a non-classical class II molecule residing in endosomal/lysosomal compartments (5,6). It catalyzes the dissociation of CLIP and is consequently required for efficient peptide loading of class II molecules (7,8). Finally, the class II molecules are transported to the cell surface where they serve as ligands for the TcRs on T cells.

B lymphocytes express still another chaperone called HLA-DO (DO; H2-O in the mouse) (9,10). This intracellular non-classical class II molecule needs to associate with DM in order to egress the ER and to be transported to the endosomes (11-14). DO was first described as a negative modulator of DM activity because its overexpression in various cell lines increased the amount of CLIP-associated MHC class II molecules at the cell surface (15-17). The influence of DO on the peptide repertoire would come, at least in part, from its ability to inhibit DM and CLIP release in early endocytic compartments but not at the low pH of late endosomes (18-20). Experiments by the group of Karlsson using H2-O-deficient mice suggested that this non-classical class II molecule can inhibit the presentation of some antigens taken up by fluid phase endocytosis and processed in early endosomes (18). Later, the same group reported that the effect of H2-O was even more drastic on antigens taken up by the specific surface Ig (sIg) receptor. Surprisingly,

the presentation of some epitopes was increased in the presence of DO, suggesting that the nature of the Ag and/or the slg will dictate DO dependency (21). Also, peptide repertoire analyses between DO<sup>+</sup> transfected cells and their DO<sup>-</sup> counterpart confirmed that various antigens benefit from the presence of DO. At steady state, about 10% of the class II peptide repertoire was specific to DO<sup>+</sup> cells (17). Accordingly, only a partial overlap was detected in the class II peptide pools eluted from H2-O<sup>-/-</sup> and +/+ animals (22).

Given its demonstrated immunomodulatory properties and its non-polymorphic nature, DO might become a valuable tool to shape the class II peptide repertoire at the surface of APCs. However, DO expression is limited mostly to B cells and ill-defined subsets of thymic epithelial cells (12,23,24). Since it is co-regulated with classical class II genes, other cell types such as dendritic cells (DCs) probably express small amount of DO $\alpha$ . However, the *DOB* gene is regulated differently and the absence of DO $\beta$  precludes the inhibition of DM (12,23,25-27).

Very recently, the group of Denzin modulated the activity of H2-M through the ectopic expression of human DO in transgenic mice DCs (28). The potential activity of DO in human DCs remains to be assessed as important differences exist in the organization and function of the endocytic pathway between various species and even cell types. Professional APCs finely tune their antigen presentation machinery according to their maturation state and their highly specialized physiological function in either the afferent or effector limb of the immune response (29). Differences in the class II maturation pathway between B cells and DCs have been documented (reviewed in (30)). For example, in B cells, crosslinking of the BCR triggers within minutes the formation of vesicles inside MIICs and the accumulation of MHC class II-



li complexes in these remodeled compartments (31,32). As for resting B cells, iDCs, found in peripheral tissues are poor T cells stimulators. Although they efficiently capture antigens, peptide loading is very inefficient. This might explain the presence at the plasma membrane of empty class II molecules that can be loaded from the outside (33). Murine iDCs awaiting maturation signals retain class II inside lysosomes by blocking the processing of li. The regulation of antigen processing is different in human as iDCs efficiently recycle class II from the surface (34). When DCs receive danger signals, they migrate and transport antigens to secondary lymphoid organs where they complete their maturation. Mature DCs no longer capture antigens but proceed to load class II molecules with antigenic peptides and redistribute most MHC class II and costimulatory molecules to the cells surface for efficient T cell stimulation (35,36). Altogether, these features highlight the cell-type specific control over antigen processing.

Other observations suggest that the cellular background could affect the function and fate of DO. The absence of DO was shown to affect the presentation of antigens differently depending on the strain genetic background or the co-expression of various class II molecules (22,37). Also, while the H2-O $\beta$  staining was negative on splenocytes from H2-O $\alpha$  KO mice, its pattern of expression was intriguingly unaltered in the thymus (18).

To gain further insights into the function of DO and to assess its activity in monocyte-derived human DCs, we used an adenoviral vector coding for either the  $\beta$  chain alone or both the  $\alpha$  and  $\beta$  chains. Our results confirm the negative effect of DO on CLIP release and demonstrate that DO modulates antigen presentation in DCs.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell culture and antibodies:

Cultures of human monocyte-derived dendritic cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 2% human AB serum (Gemini Bio-products, Woodland, CA), 2mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, referred to as complete medium. HEK 293 cells (obtained from E. Cohen, Montreal) were cultured in DMEM medium supplemented with 5% FBS.

L243 (IgG<sub>2a</sub>) mAb binds a DR $\alpha$  conformational epitope (38,39). Anti-CD14 and -CD83 mAbs were from Immunotech (Marseille, France). HKC5 mAb reacts against the cytoplasmic tail of HLA-DO $\beta$  (40). MaP.DM1 (DM-specific; Pharmingen, Oakville, ON) has been described previously (41). Mags.DO (IgG<sub>1</sub>) recognizes a conformational determinant of DO bound to DM (42). Cer.CLIP (IgG<sub>1</sub>) is directed at the N-terminal segment of CLIP bound to class II molecules (41), (Pharmingen). H5C6 (IgG<sub>1</sub>) is specific to CD63 molecules found in late endosomes (Developmental Studies Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa). The polyclonal rabbit anti-calnexin recognizes the C-terminal part of the protein (Stressgen, Victoria, BC). Goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor® 488, goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor® 594 and streptavidin coupled to Alexa Fluor® 594 were from Molecular Probes (Eugene, Oregon). The rabbit antisera against the cytoplasmic tail of HLA-DO and HLA-DM have been described previously (13). Anti-actin (IgG<sub>1</sub>) is specific for the N-terminal of the molecule (Chemicon International, Temecula, CA). Peroxidase-coupled goat anti-rabbit and goat anti-mouse secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Mississauga, ON).

**Adenoviral vectors and DC infection:**

The empty adenoviral vector (Ad0) is a replication-deficient recombinant adenovirus derived from serotype 5 with the deletion of E1 and E3 regions (43). AdDO $\beta$  and AdDO encode the DO $\beta$  chain and both DO $\alpha$  and DO $\beta$ , respectively. The cDNAs were cloned in the pAdenovator CMV5(CuO) in which the transgenes are driven by the repressible cumate promotor CMV5(CuO) (44). Functional viruses were produced as described (45). Briefly, following recombination in bacteria, recombinant adenoviral DNAs were transfected in 293 cells, which complement for the deleted E1 gene. The cell monolayers were then covered with agarose and incubated until formation of viral plaques. Viruses were eluted from agarose plugs, propagated by several round of 293 cell infections and purified by double centrifugation on CsCl gradients. Virus aliquots were stored at -80°C until use.

For adenoviral transduction, DCs were distributed in flat-bottom 96-well plates (Costar Corning inc., Corning, NY) at  $2.5 \times 10^5$  cells/well in 50  $\mu$ l of RPMI 1640 medium to favor virus adsorption. Viruses were added at a MOI of 250 and incubated at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> for 3 hours. Complete media supplemented with 2 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was added on cells in a final volume of 200  $\mu$ l and incubated for 2 days to allow complete maturation of DCs.

**Isolation and culture of dendritic cells:**

PBMCs were purified from leukapheresis of healthy donors by Ficoll-Paque™ PLUS gradient centrifugation (Amersham Biosciences, UK). PBMCs were cryopreserved in RPMI medium containing 20% FBS and 10% DMSO. Monocytes were isolated either by adherence or positive selection. Similar results were obtained using cells prepared by these two methods. Briefly, PBMCs were plated at  $9 \times 10^6$  cells/well in 6-well

plates (Costar Corning inc.) in RPMI 1640 medium without serum at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. After 1h, repeated washings with PBS removed non-adherent cells. Alternatively, monocytes were purified using Easysep CD14<sup>+</sup> cell separation kit (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) and placed in 6-well plates (Costar Corning inc.) at 2x10<sup>6</sup> cells/well. In order to generate immature DCs, monocytes were cultured for 7 days in complete medium containing 1 000 U/ml human GM-CSF (CANGENE Corporation, Winnipeg, MB) and 300 U/mL IL-4 (Sigma-Aldrich). Every 2 days, fresh complete medium containing GM-CSF and IL-4 was added. To produce mature DCs, fresh complete medium supplemented with 2ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) was added for 48h on day 7.

#### **Flow cytometry:**

Cells were stained for the presence of cell surface HLA-DR, CD86, CD83, CD14 and CLIP using, L243, anti-CD86, anti-CD83, anti-CD14 and Cer.CLIP mAbs, respectively. For intracellular staining, cells were first permeabilized using saponin as previously described (13). We used a secondary goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor® 488 for both surface and intracellular staining. Cells were analyzed on a FACScalibur® (Becton Dickinson, Mississauga, ON).

#### **Western blotting:**

8 X 10<sup>6</sup> dendritic cells were left untreated or transduced with Ad0, AdDOβ or AdDO. Cells were washed with PBS and lysed at 4°C 30 min in lysis buffer (20mM Tris, pH7 and 150mM NaCl) containing protease inhibitor (Roche Diagnostics, Laval, QC) and 2% Triton X-100. After centrifugation, supernatants were harvested and resuspended in reducing buffer. One half of each sample was boiled and subjected to

SDS-PAGE. The other half was boiled and treated with endoglycosidase H (EndoH) (New England Biolabs, Ltd., Mississauga, ON) according to manufacturer's protocols before SDS-PAGE. Each well was loaded with proteins from  $1 \times 10^6$  cells. After protein transfer, the membranes (Amersham Biosciences, Montreal, QC) were blotted with the various antibodies. A secondary peroxidase-coupled antibody was added for 1h before detection (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD); Roche Diagnosis, Laval, QC).

#### **RT-PCR amplifications:**

Total RNA was extracted from HeLa cells and DCs using Tri Reagent isolation solution (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's recommendations. cDNA was prepared by reverse transcription (RT) with random nonamer primers and M-MLV RT (Sigma-Aldrich). PCR was performed for 40 cycles with denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 56°C for GAPDH and HLA-DO $\beta$  or 52°C for HLA-DO $\alpha$  for 45 seconds and elongation at 68°C for 2 minutes. Three pairs of oligonucleotide PCR primers targeting HLA-DO $\alpha$ , HLA-DO $\beta$  and GAPDH genes were synthesized and the sequences were as follows: HLA-DO $\alpha$  (5'-CCA CTC AAA GTC AGC ACA GCG-3' ; 5'-TGG TCC TGG GGT TCC AC-3'), HLA-DO $\beta$  (5'-CAG TGA CTA CCT GAG CAT TTG-3' ; 5'-AAC CAG AGG TGA CAG TGT), GAPDH (5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3' ; 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3').

#### **Fluorescence microscopy:**

Cells were permeabilized and stained as previously described (13). After centrifugation on microscope slides at  $0.2-1 \times 10^5$ /slides, cells were examined with a Leica TCS-SP1 confocal microscope using a X100 planapochromat objective.

**Functional analysis:**

For mixed lymphocyte reactions (MLR), allogeneic T cells were purified from PBMCs using Easysep CD4<sup>+</sup> negative selection kit (Stemcell Technologies, Vancouver, BC). About  $2.5 \times 10^4$  mature DCs transduced on day 7 with AdDO, AdDO $\beta$  or Ad0 were mixed with increasing numbers of CD4<sup>+</sup> T cells in flat-bottom 96-well plates in a final volume of 200  $\mu$ l. After 5 days of incubation, 1 $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H] thymidine (Amersham, Biosciences, UK) was added overnight and its uptake measured the day after.

**Pulsing of dendritic cells and recognition by anti-gp100 T cell clone:**

Lysates from melanoma cell lines expressing gp100 (MeIS gp100) or GFP (MeIS GFP) and the CD4<sup>+</sup> T cell clone specific to an HLA-DR $\beta$ 1\*0701-restricted gp100 epitope were prepared as previously described (46). MeIS gp100 and MeIS GFP were derived from a melanoma cell line retrovirally transduced with either gp100 or GFP cDNAs (47). Monocyte derived-dendritic cells from a DR $\beta$ 1\*0701 healthy donor were either not transduced or transduced with AdDO $\beta$ , AdDO or Ad0 on day 6. On day 8, cells were plated at  $2.5 \times 10^4$  cells/well in 96-well plates in 150  $\mu$ l of complete medium. MeIS gp100 or control MeIS GFP lysates were added for 10 hours. Then, LPS was added overnight in the presence of MeIS cell lysates. Then,  $4 \times 10^4$  gp100-specific T cells were added for an additional 24 hours. Supernatants were harvested and INF- $\gamma$  was measured by ELISA.

## RESULTS

### Monocyte-derived DCs do not express DO $\beta$

DCs represent a highly heterogeneous population of cells. We have used monocyte-derived DCs since they can be easily purified in large quantities and allow the study of both the immature and mature phenotypes (48). Moreover, these cells are currently being used in immunotherapy (49). CD14<sup>+</sup> adherent monocytes from peripheral blood of healthy donors were used to derive immature DCs. The cells were grown for 7 days in the presence of IL-4 and GM-CSF to obtain immature DCs (iDCs) expressing HLA-DR as well as low levels of CD86 co-stimulatory molecule and CD83 (Fig.1A). These cells can reach a mature (mDCs) phenotype after LPS treatment for 48h (Fig.1A, right column). In these conditions, as previously described, the CD14<sup>+</sup> cells dramatically increased the surface expression of HLA-DR, CD86 and CD83 (48).

We have monitored by RT-PCR the basal expression levels of each of the *HLA-DOA* and *-DOB* genes. Class II negative HeLa cells were used as negative control. As positive control, we have used HeLa cells stably transfected with the class II transactivator CIITA (HeLa CIITA), which activates transcription of both genes in these cells (40). Figure 1B shows that iDCs and mDCs express significant levels of DO $\alpha$  mRNA as compared to the signal obtained for the constitutively expressed GAPDH control. On the other hand, DCs do not express any mRNA for DO $\beta$  in this semi-quantitative assay (Fig. 1B, middle panel), in line with the reported lack of HLA-DO proteins in DCs (27,50).

### Adenoviral vectors do not trigger full maturation of DCs

The above-described results confirmed that the discordant regulation of the endogenous  $\alpha$  and  $\beta$  chains precludes DO expression in DCs. In

order to express the DO $\alpha\beta$  heterodimer in these cells, we generated adenoviral vectors. The use of adenoviruses (Ad) for gene transfer has many advantages for immunotherapy (51). Recombinant adenoviruses are not dependent on active cell division and are thus very efficient in non-dividing primary cells like DCs. Additionally, high titers and high levels of gene expression can be achieved.

Two approaches were used to restore HLA-DO expression in DCs (Fig. 2A). Given the significant expression of the *DOA* gene (see Fig.1), we reasoned that one could complement the endogenous pool of DO $\alpha$  chain by transducing the DO $\beta$  chain alone. However, to ascertain maximal expression of the heterodimer, we also constructed a cassette bearing both the DO $\alpha$  and DO $\beta$  cDNAs separated by an internal ribosome entry site (IRES). The shuttle vectors were allowed to recombine in bacteria with the adenoviral plasmid in order to produce recombinant AdDO $\beta$  and AdDO viruses.

The effect of gene transduction on the maturation of DCs was assessed using the AdDO $\beta$  construct. DCs are not efficiently infected with adenoviruses because they do not express the Coxsackie B and adenovirus receptor (CAR), which is required for efficient virus entry (52). Additional interactions with surface integrins exist which also permit the entry of adenoviruses (53). We used MOIs of at least 250 to reach a balance between transduction efficiencies and toxicity. Figure 2B shows that transduced iDCs display an intermediate phenotype between immature and mature cells. While the DR expression was increased in all cells to levels normally triggered by LPS, the expression of CD83 was not maximal. Although the transduction efficiency was almost 100% in these conditions (data not shown), these results suggest that a fraction of the cells do not fully mature in response to Ad-



mediated gene transfer. Then, we assessed if the transduced DCs can adopt a completely mature phenotype in the presence of LPS. Based on the surface markers described above, figure 2C shows that the combination of LPS and Ad allows full maturation of the DC population.

### **Transduction of HLA-DO in DCs**

Monocyte-derived iDCs were transduced with either the control Ad0, AdDO $\beta$  or AdDO. After a maturation period of 48h in the presence of LPS, cell lysates were prepared and the DO $\alpha$  chain expression was analyzed by western blotting. Lysates were also treated with Endo H to reveal the presence of resistant forms, indicating their passage through the Golgi (Fig.3A). As previously described, control HeLa cells transfected with DO $\alpha\beta$  do not contain EndoH-resistant molecules, reflecting the efficient ER retention in the absence of DM (11). Indeed, upon co-expression of DM, both molecules end-up in the endocytic pathway and their carbohydrates become resistant to EndoH processing. Despite the presence of its mRNA (see Fig. 1), the endogenous DO $\alpha$  protein was undetectable in untransduced DCs or those transduced with the control Ad0. This most likely reflects the combination of a low level of expression and the absence of a  $\beta$  chain partner. Interestingly, transduction of DO $\beta$  in these DCs was not sufficient to allow the detection of DO $\alpha$ , even upon overexposure of the blots (data not shown). On the other hand, Endo H-resistant forms of HLA-DM $\beta$  were detected in all conditions. These results suggest that low levels of endogenous DO $\alpha$  proteins are present in DCs. The possibility remains that our rabbit antiserum made against a peptide of the cytoplasmic tail does not bind the endogenous DO $\alpha$  chain in DCs. However, this is unlikely as it recognizes the endogenous form found in primary B cells or in CIITA transfectants ((46) and Fig.3A). Also, the size

of the cDNA fragment covering the cytoplasmic tail coding region was similar in all cells tested (see figure 1).

The DO $\alpha$  chain was detected on western blots only upon transduction of both chains as part of the AdDO construction (Fig.3A). A strong signal was detected and, although the majority of the molecules were EndoH-sensitive, the presence of a faint band co-migrating with the untreated material suggests that a fraction has acquired complex sugars and has egress the ER en route to the endocytic pathway (Fig.3A, top right panel). The apparent overexpression of DM in cells transduced with AdDO is in line with the stabilization of H2-M in mouse DCs expressing DO (28). Altogether, these results indicate that AdDO can efficiently transduce DO $\alpha$  in DCs.

We next investigated the expression of DO by flow cytometry using mAb HKC5 specific for a linear epitope in the DO $\beta$  cytoplasmic tail (40). Analysis of permeabilized cells revealed that both the AdDO $\beta$  and AdDO vectors are highly efficient in transducing the  $\beta$  chain (Fig 3B). No DO $\beta$  chain was detected in mock cells transduced with the Ad0 vector, in agreement with the absence of DO $\beta$  transcripts or proteins in DCs (see figure 1 and (27,50)). From the HKC5 staining profile, we estimate that more than 90% of the DCs have been transduced and express levels of DO $\beta$  equal or superior to B cell lines such as Raji cells(data not shown). The strong expression of DO $\beta$  was confirmed by western blotting and, again, the presence of EndoH-resistant forms is almost undetectable (Fig.3B, right panel). Transduced cells were then analyzed by flow cytometry using the Mags.DO mAb, which is specific for DO bound to DM (42). Interestingly, there was very little difference between the signals obtained for the DCs transduced with DO $\beta$  alone as compared to

cells transduced with the  $\alpha\beta$  chains together (Fig.3B). Since this antibody recognizes DM-associated DO molecules, this result probably reflects the fact that the amount of endogenous DO $\alpha$  chain is nearly sufficient to saturate the available pool of free DM. Finally, the fact that the Mags.DO profile is rather homogenous as compared to the wide distribution seen with HKC5 indicates that very little DO $\beta$  is required to achieve maximal binding of DM. This would be consistent with the fact that only a small proportion of DO acquired resistance to EndoH.

### **Intracellular distribution of transduced DO molecules**

To ensure that DO molecules expressed in DCs behave as in B cells, we determined their sub-cellular localization by confocal microscopy using HKC5 and Mags.DO. DO $\beta^+$  DCs stained with HKC5 display a diffuse pattern that overlaps the one obtained for calnexin, an ER marker (Fig.4A, panels a-c). This co-localisation between calnexin and DO $\beta$  supports the conclusion reached above that the transduced molecules were produced in vast excess. The ER signal is very strong but it is possible to detect weak co-localization with the CD63 marker of late endosomes (Fig.4A, panels d-f). This is the first indication that DO gains access to endosomes in DCs. This conclusion is strengthened by the subcellular distribution of DO observed with Mags.DO. This antibody recognizes DO bound to DM and, accordingly, there was no overlap with calnexin (Fig.4A, panels g-i). A clear co-localisation was detected with CD63, confirming that DM is highly efficient in releasing DO from ER retention (panels j-i). These experiments were repeated with similar results using DCs transduced with AdDO (Fig.4B). In addition, a strong co-localisation was observed in vesicular structures between Mags.DO and the DM-specific antibody (panels j-l).

Small amounts of DM have been detected at the surface of B cells and DCs (19,33). We reasoned that DO might be dragged by DM at the plasma membrane of DCs. To test this hypothesis, transduced cells were stained with Mags.DO and analyzed by flow cytometry. Figure 4C shows that a substantial amount of DO reaches the cell surface and the strongest signal was obtained upon transduction of both chains of the heterodimer. Altogether, these results suggest that transduced  $\alpha$  and  $\beta$  chains are produced in vast excess and that DO molecules associating with DM are rapidly transported to the endosomes, possibly after internalization from the plasma membrane.

### **DO modulates antigen processing in DCs**

The sub-cellular localization of transduced DO inside the endocytic pathway of DCs validates further studies regarding its potential role in antigen processing. First, we monitored the inhibition of CLIP release by flow cytometry using the Cer.CLIP antibody specific for class II-CLIP complexes (41). Our results show the endogenous DO $\alpha$  and transduced DO $\beta$  are sufficient to inhibit DM and increase the surface expression of CLIP (Fig.5A). DCs transduced with the control Ad0 construct only showed basal levels of CLIP. Overexpression of both DO $\alpha$  and  $\beta$  chains slightly and reproducibly increased the levels of CLIP, proportionally to the increase in MagsDO staining (Figure 3B). These results suggest that DO, as in B cells and various transfectants, gains access to early endosomes where the pH allows its inhibitory activity to manifest.

The fact that DO efficiently modulates the peptide repertoire in DCs suggests that it could affect the presentation of endogenous peptides beyond the inhibition of CLIP release. Results obtained so far in a variety of systems using mouse cells suggest that DO and H2-O do not have a significant impact on the presentation of endogenous antigens

(18,22,28). Conflicting results were obtained for the presentation of E $\alpha$ 52-63/H-2A<sup>b</sup> peptide using H2-O deficient cells or transfectants overexpressing the chaperone (20,37). Another study demonstrated that the expression of H2-O does not affect the presentation in vivo and in vitro of endogenous antigens by class II<sup>+</sup> tumor cells (54). To gain further insights into this issue, we tested the potency of our transduced human DCs in a mixed lymphocyte reaction. In this assay, T cell proliferation relies, at least in part, on the recognition of foreign class II molecules bound to DM-dependent natural peptides (55). DCs were incubated at various ratios with purified CD4<sup>+</sup> T cell from an unrelated donor. T cell activation was assessed by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation. While DCs preparations did not show any proliferation in the absence of added T cells, a strong alloresponse was measured when T cells and DCs were co-incubated (Fig.5B). Non-transduced and transduced DCs were equally effective in this assay. Similar results were obtained with different combinations of donors (data not shown). Thus, the consequence of DO expression on CLIP release and antigen processing does not affect, at least quantitatively, the alloresponse triggered by transduced DCs.

It has been proposed that the inhibition of H2-M/DM by "O" molecules in early endocytic compartments could prevent the presentation of antigens internalized by fluid-phase endocytosis (18). Since DCs are highly efficient in the capture and internalization of antigens (34), we addressed the possible role of DO in modulating the presentation of exogenous gp100. We have recently suggested that the down-regulation of DO in CD40-activated B cells could contribute to the enhanced presentation of this tumor antigen (46). Lysates were prepared from the MeIS melanoma cell line transfected with gp100 and pulsed on transduced DCs. The cells were treated with LPS to complete

their maturation and co-cultured with the gp100-specific, DRB1\*0701-restricted T cell clone. Results show that the DO<sup>+</sup> DCs were less efficient in presenting the gp100 epitope than cells transduced with the empty Ad0 (Fig.5C, left panel). The effect was reproducibly more pronounced when using a limiting amount of antigens. The negative control represents a lysate from MeIS cells transfected with GFP. We also compared the effect of titrating the amount of DO by comparing the stimulation obtained with AdDO $\beta$ - versus AdDO-transduced DCs (Fig.5C, right panel). The results show that cells transduced with both DO chains (AdDO), which displayed more Mags.DO-positive complexes and more cell surface CLIP (see figure 2), were less potent in processing and presenting the gp100 peptide. Again, this effect of DO was more pronounced when using limited amounts of antigens. Finally, a DO molecule with a mutation reducing the interaction with DM did not inhibit the presentation of gp100 (Bellemare-Pelletier, A., Deshaies, F., and Thibodeau, J., unpublished data). Altogether, these results demonstrate the capacity of DO to modulate the peptide repertoire of DCs and to affect the processing of soluble exogenous antigens.

## DISCUSSION

DCs are at the forefront of the immune response and orchestrate the defense against invaders and tumors. These cells are also used as therapeutic vaccines for the induction of T cell responses against tumor-associated antigens. MHC class II presentation to CD4<sup>+</sup> T cells is crucial for providing help to DCs and cytotoxic T cells and for the establishment of an efficient immune response (56-58).

Manipulation of the class II pathway offers interesting possible avenues for the development of tumor vaccines. More specifically, invariant chain has been modified to encode and deliver T cell epitopes to peptide loading compartments of the endocytic pathway (59,60). Also, inhibition of invariant chain expression in class II<sup>+</sup> cancer cells has been used to derive efficient cell-based vaccines against unknown tumor antigens in animal models (61,62). HLA-DM affects the peptide repertoire independently of the presence of Ii, suggesting that it might also serve as a target to modulate the efficiency of vaccination (63). Moreover, DM was shown to determine the immunodominant fate of T cell epitopes (64). Inhibition of DM in class II<sup>+</sup> cancer cells could allow the presentation of cryptic epitopes from tumor antigens and boost the anti-tumor immune response. Indeed, the immunological response to antigens is usually directed against a narrow set of immunodominant peptides derived from complex antigens (65). Other epitopes are hidden because of inadequate processing or low affinity for MHC molecules. The unmasking of cryptic determinants through epitope spreading has been described and could have important practical implication for the development of immunization strategies (66). In this context, it is interesting that B lymphocytes express a natural regulator of HLA-DM and antigen processing. One could thus envisage using DO to modulate DM in tumor antigen-pulsed DCs and to activate new T cell specificities

capable of recognizing tumors expressing very low levels of cryptic epitopes. Indeed, under rules that have yet to be defined, DO was shown to up-regulate the presentation of some peptides. Deciphering the molecular aspects of its regulatory activity could help the design of powerful immunomodulators, not only for B cell responses, but also for DCs used in immunotherapy or vaccination.

So far inseparable from its immunomodulatory properties, the ability of HLA-DO to inhibit CLIP release from class II molecules could be clinically relevant. Auto-bone marrow transplant (BMT) following chemotherapy or irradiation represents an efficient curative therapy for many patients with acute or even chronic leukemias, as well as for patients with lymphomas or breast cancer (67-69). Following autoBMT and cyclosporin A treatment, an anti-tumor activity develops in parallel to the establishment of a GVHD (70). Surprisingly, in a rat model, the CD8<sup>+</sup> effector T lymphocytes responsible for such graft-versus-leukemia activity are directed at CLIP-associated MHC class II molecules (71). Combining bone marrow transplants and adoptive immunotherapies based on DO<sup>+</sup>, CLIP<sup>+</sup> DCs might boost the GVL efficiency and therapeutic benefits of auto-BMT.

Expression of endogenous DO $\alpha$  and  $\beta$  in DCs has been controversial for some times, probably due to the use of various cell types or the choice of antibodies (12,24,27). The differential regulation of the  $\alpha$  and  $\beta$  and chains warrants precautions in the interpretation of the data (23,72). Clearly, both the  $\alpha$  and  $\beta$  chains are required to form an active molecule capable of binding to DM and gain access to the endocytic pathway (11). Our RT-PCR, western blotting and confocal microscopy analyses confirm that DCs do not express functional DO $\alpha\beta$  heterodimers. The expression of endogenous  $\alpha$  chain seems low in DCs as it was not



detected by western blotting. This could be due to the relatively short half-life of its mRNA and to the absence of a stabilizing  $\beta$  chain (25). Indeed, transduction of DO $\beta$  alone was sufficient to generate functional DO molecules, as judged by the presence of Mags.DO positive molecules in the endocytic pathway of transduced DCs and the increased surface expression of CLIP (Fig.4 and 5).

Many evidences suggested that the amount of DM molecules available for interacting with DO is low in our experimental system: 1) very few DO $\alpha$  and DO $\beta$  chains acquired resistance to EndoH. This is particularly striking when comparing with transfected HeLa cells (Fig.3A). 2) transducing both DO  $\alpha$  and  $\beta$  chains did not dramatically increase, over transduction of DO $\beta$  alone, the Mags.DO $^{+}$  species or the surface expression of CLIP. 3) a large fraction of the transduced DO $\beta$  co-localizes with the ER resident protein calnexin. 4) all the DM molecules are EndoH-resistant on the western blot analysis and are found in the endocytic vesicles by immunofluorescence microscopy (Fig.3A and 4B) and 5) the amount of CLIP is not as important as what is seen for example on B cell lines or transfectants expressing DO (data not shown). These results could be explained by a slowing down of the DM transcription upon DCs transduction and maturation. Indeed, it was recently showed that LPS-induced maturation of DCs results in the arrest of CIITA gene transcription and class II expression (73). Transduction by the adenoviral vector initiated the maturation of the DCs (Fig. 2) and could have shut down CIITA transcription. There is still a controversy as to the effect of viral vectors on iDCs (see (74) and references therein). Our results are in agreement with those of Rea and collaborators showing that adenoviral vectors trigger some phenotypic changes in iDCs as judged by the increase in DR expression and the modest up-regulation of CD83 (75).

In the light of the CIITA down-regulation in mDCs and to maximize the yield of active DO molecules, we are considering an alternative approach where the dispensable DO $\alpha$  cDNA would be replaced by CIITA in our adenovirus AdDO construction (76,77). Thus, a larger pool of every molecule involved in antigen processing (including DO $\alpha\beta$ ) would be synthesized simultaneously. Also, we could use a DO $\beta$  mutant devoid of its cytoplasmic di-leucine sorting motif (13,14). This mutation was shown in Mel JuSo cells to further inhibit CLIP release and to redistribute DM from the internal vesicles to the limiting membrane of multivesicular bodies (14). Again, one has to bear in mind that the results obtained in cell lines might not be reproducible in DCs (78). Additional experiments will be needed to maximize the impact of DO in DCs. For example the need for LPS and the timing of transduction and of antigen delivery are all issues that need to be carefully tuned.

DO was shown to play a preponderant role for the presentation of antigens taken up by the specific, high affinity surface Ig on B lymphocytes (21). The effect of DO, if any, on the processing of antigens internalized through other receptors such as the complement receptor (CR), DEC 205 or the macrophage mannose receptor (MMR) remains to be analyzed (79,80).

The inhibition of DM by DO does not parallel the dramatic phenotype observed in DM negative cells or mice. This reflects the fact that there is always some free DM in DO<sup>+</sup> cells and that DO does not inhibit DM in acidic compartments (18,27). Clearly, the role of DO could not be reproduced by the mere inhibition of DM for example with siRNA. As opposed to DM<sup>-</sup> APCs from KO animals which triggered an allogeneic response in syngenic wild-type animals, DO<sup>-</sup> splenocytes did not affect T cell recognition. Accordingly, our results confirmed that DO<sup>+</sup> DCs do not

alter the alloresponse (28). This does not entirely rule out an effect of DO on the presentation of endogenous antigens. Qualitative variations might be revealed once the repertoire of alloreactive T cells toward DO positive and negative APCs is carefully compared (63).

Altogether, our results demonstrate the functionality of HLA-DO expressed in human monocyte-derived dendritic cells. This system should allow the identification of some therapeutically relevant tumor antigens showing enhanced presentation in these conditions. Still, the demonstrated ability of DO to reduce processing could favor the activation of high avidity T cells. Further studies will be needed to understand the rules governing the immunomodulatory effects of DO and to maximize its potential in DCs.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Dendritic cells do not express DO $\beta$  mRNA.** PBMCs were purified from leukapheresis by Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS gradient centrifugation. Monocytes were isolated by adherence in medium without serum. Non-adherent cells were removed by repetitive washings. Monocytes were cultured for 7 days in complete medium containing GM-CSF and IL-4 in order to generate iDCs. At day 7, to induce maturation, fresh medium supplemented with LPS was added for 2 days. **(A)** Flow cytometry analysis of DCs stained for surface expression of differentiation markers. Filled histograms represent DCs incubated with an irrelevant primary mouse mAb. **(B)** DOA and DOB gene expression was analyzed by RT-PCR on total cellular RNA. GAPDH-specific primers were used to ascertain RNA integrity.

**Figure 2. Adenovirus does not allow full maturation of DCs.** **(A)** Two vectors were constructed for the expression of DO $\beta$  alone or both the  $\alpha$  and  $\beta$  chains. The expression cassettes were cloned in the multiple cloning sites of the adenoviral transfer vector containing parts of the Ad5 genome to allow homologous recombination. Genes were expressed from the repressible cumate promotor CMV5(CuO). The empty adenovirus was used as negative control. **(B)** iDCs were either matured with LPS (mature n-trans; filled histogram) or infected with the AdDO $\beta$  vector (transduced; black line). Maturation was monitored after 48h by monitoring CD83 and HLA-DR expression. **(C)** Maturation markers were monitored on iDCs incubated with LPS (mature n-trans; filled histogram) and on iDCs transduced with the AdDO $\beta$  vector and treated with LPS to achieve full maturation (transduced; black line). Secondary antibody was Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG.

### Figure 3. Transduced DCs express high levels of DO

Monocyte-derived DCs were transduced with the control Ad0, the AdDO or the AdDO $\beta$  viruses and maturation was completed in the presence of LPS. **(A)** Non-transduced and transduced DCs were lysed in Triton X-100 and either non-digested or digested with Endo H. Samples were then analyzed by western blotting using the DO $\alpha$ -, DM $\beta$ - or actin-specific antibodies. Lysates from HeLa, HeLa DO and HeLa DO/DM cells represent additional controls. The thin black arrow shows mature Endo H-resistant proteins while the filled arrowhead indicates Endo H-sensitive molecules. In the track of HeLa DO cells without EndoH, the corresponding band most probably represents a degradation product. The open arrow shows this degradation fragment following EndoH treatment in DM-negative cells. **(B)** DCs were transduced with the Ad0 (shaded histogram), AdDO $\beta$  (gray line) or the AdDO (black line) viruses. Cells were permeabilized in saponin and stained with the DO $\beta$ -specific HKC5 or the conformation-specific Mags.DO antibodies. These transduced cells were compared to non-transduced DCs for the expression of DO $\beta$  by western blotting using the HKC5 antibody. Arrowhead indicates EndoH sensitive species.

### Figure 4. HLA-DO reaches endosomes in transduced dendritic cells

Day 7 iDCs were kept untreated or transduced with AdDO or AdDO $\beta$  viruses and incubated for 48h in the presence of LPS. **(A)** Confocal microscopy was performed on saponin-permeabilized DCs simultaneously stained for DO $\beta$  and calnexin (a,b,c), DO $\beta$  and CD63 (d,e,f), DO and calnexin (g,h,i) or DO and CD63 (j,k,l). Antibodies used were Alexa Fluor® 488-conjugated HKC5, Alexa Fluor® 647-conjugated Mags.DO, anti-calnexin polyclonal Ab with Alexa Fluor® 594-coupled goat anti-rabbit and biotinylated anti-CD63 with Alexa Fluor® 594-

coupled-avidin. White arrowheads indicate untransduced DCs as internal negative controls. **(B)** Confocal microscopy analysis on saponin-permeabilized DCs transduced with AdDO and stained as in panel A. Panel m and n represent simultaneous staining of DO and DM using Mags.DO and Map.DM1 antibodies. **(C)** Day 7 iDCs were transduced with Ad0 (filled histogram), AdDO $\beta$  (gray line) and AdDO (black line) and incubated in presence of LPS for 48h. Cells were surface-stained using mAb Mags.DO and analyzed by flow cytometry. Alexa Fluor® 488-conjugated goat antimouse IgG was used as secondary antibody.

**Figure 5. HLA-DO modulates antigen processing in DCs.** Day 7 immature DCs were kept untreated or transduced and incubated for 48h in presence of LPS. **(A)** Surface expression of CLIP-bound MHC class II molecules on Ad0- (filled histogram) AdDO $\beta$ - (gray line) and AdDO-transduced DCs (black line). Alexa 488-conjugated goat antimouse IgG was used as secondary antibody. **(B)** Mixed lymphocyte reaction using graded doses of non-transduced, AdDO- and Ad0-transduced DCs mixed with alloreactive T cells. mDCs alone were used as control. **(C)** Day 7 iDCs were kept untreated or transduced with AdDO, AdDO $\beta$  or Ad0 before incubation with a MelS gp100 lysate. Antigen processing was assessed by co-culturing DCs with a HLA-DR $\beta$ 1\*0701-restricted T cell clone specific for an epitope of gp100. IFN- $\gamma$  was measured using an ELISA assay (pg/ml). On the left panel, a MelS-GFP lysate was used as negative control. The MelS-gp100 lysate was prepared from  $1 \times 10^7$  cell/ml and was used either undiluted or diluted 5 to 25 times.

**ABBREVIATIONS**

Ad: adenovirus

APC: antigen presenting cell

CLIP: class II-associated invariant chain peptide

DC: dendritic cell

Endo H: endoglycosidase H

ER: endoplasmic reticulum

Ii: invariant chain

KO: Knock out

MHC: major histocompatibility complex

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

slg: surface immunoglobulin

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Rafick Sékaly for helpful discussions. We thank Angela Samaan and Lisa Denzin for the generous gift of antibodies. The H5C6 monoclonal antibody developed by J.T. August and J.E.K. Hildreth was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242.



## REFERENCES

1. Germain, R. N. 1994. MHC-dependant antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-299.
2. Pieters, J. 1997. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* 9:89-96.
3. Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 12:259-293.
4. Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-507.
5. Sanderson, F., M. J. Kleijmeer, A. Kelly, D. Verwoerd, A. Tulp, J. J. Neefjes, H. J. Geuze, and J. Trowsdale. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 266:1566-1569.
6. Pierre, P., L. K. Denzin, C. Hammond, J. R. Drake, S. Amigorena, P. Cresswell, and I. Mellman. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity* 4:229-239.
7. Denzin, L. K. and P. Cresswell. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155-165.
8. Sloan, V. S., P. Cameron, G. Porter, M. Gammon, M. Amaya, E. Mellins, and D. M. Zaller. 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375:802-806.

9. Alfonso, C. and L. Karlsson. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 18:113-142.
10. Chen, X. and P. E. Jensen. 2004. The Expression of HLA-DO (H2-O) in B Lymphocytes. *Immunol.Res.* 29:19-28.
11. Liljedahl, M., T. Kuwana, W. P. Fung-Leung, M. Jackson, P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15:4817-4824.
12. Douek, D. C. and D. M. Altmann. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int.Immunol.* 9:355-364.
13. Brunet, A., A. Samaan, F. Deshaies, T. J. Kindt, and J. Thibodeau. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.
14. van Lith, M., M. van Ham, A. Griekspoor, E. Tjin, D. Verwoerd, J. Calafat, H. Janssen, E. Reits, L. Pastoors, and J. Neefjes. 2001. Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *J.Immunol.* 167:884-892.
15. Denzin, L. K., D. B. Sant'Angelo, C. Hammond, M. J. Surman, and P. Cresswell. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-109.
16. Van Ham, S. M., E. P. M. Tjin, B. F. Lillemeier, U. Gruneberg, K. E. Van Meijgaarden, L. Pastoors, D. Verwoerd, A. Tulp, B. Canas, D. Rahman, T. H. Ottenhoff, D. J. Pappin, J. Trowsdale,

- and J. Neefjes. 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7:950-957.
17. van Ham, M., M. van Lith, B. Lillemeier, E. Tjin, U. Gruneberg, D. Rahman, L. Pastoors, K. van Meijgaarden, C. Roucard, J. Trowsdale, T. Ottenhoff, D. Pappin, and J. Neefjes. 2000. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J.Exp.Med.* 191:1127-1136.
  18. Liljedahl, M., O. Winqvist, C. D. Surh, P. Wong, K. Ngo, L. Teyton, P. A. Peterson, A. Brunmark, A. Y. Rudensky, W. P. Fung-Leung, and L. Karlsson. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233-243.
  19. Kropshofer, H., A. B. Vogt, C. Thery, E. A. Armandola, B. C. Li, G. Moldenhauer, S. Amigorena, and G. J. Hammerling. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 17:2971-2981.
  20. Brocke, P., E. Armandola, N. Garbi, and G. J. Hammerling. 2003. Downmodulation of antigen presentation by H2-O in B cell lines and primary B lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 33:411-421.
  21. Alfonso, C., G. S. Williams, J. O. Han, J. A. Westberg, O. Winqvist, and L. Karlsson. 2003. Analysis of H2-O influence on antigen presentation by B cells. *J.Immunol.* 171:2331-2337.
  22. Perraudeau, M., P. R. Taylor, H. J. Stauss, R. Lindstedt, A. E. Bygrave, D. J. Pappin, S. Ellmerich, A. Whitten, D. Rahman, B. Canas, M. J. Walport, M. Botto, and D. M. Altmann. 2000. Altered

major histocompatibility complex class II peptide loading in H2-O-deficient mice. *Eur.J.Immunol.* 30:2871-2880.

23. Tonnelie, C., R. DeMars, and E. O. Long. 1985. DO $\beta$ : a new  $\beta$  chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-2847.
24. Karlsson, L., C. D. Surh, J. Sprent, and P. A. Peterson. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 351:485-488.
25. Trowsdale, J. and A. Kelly. 1985. The Human HLA class II  $\alpha$  chain DZ $\alpha$  is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO J.* 4:2231-2237.
26. Taxman, D. J., D. E. Cressman, and J. P. Ting. 2000. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN  $\alpha$ /DO  $\beta$  heterodimer. *J.Immunol.* 165:1410-1416.
27. Chen, X., O. Laur, T. Kambayashi, S. Li, R. A. Bray, D. A. Weber, L. Karlsson, and P. E. Jensen. 2002. Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. *J.Exp.Med.* 195:1053-1062.
28. Fallas, J. L., H. M. Tobin, O. Lou, D. Guo, D. B. Sant'Angelo, and L. K. Denzin. 2004. Ectopic expression of HLA-DO in mouse dendritic cells diminishes MHC class II antigen presentation. *J.Immunol.* 173:1549-1560.
29. Mellman, I. and R. M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.

30. Bryant, P. and H. Ploegh. 2004. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr.Opin.Immunol.* 16:96-102.
31. Siemasko, K., B. J. Eisfelder, E. Williamson, S. Kabak, and M. R. Clark. 1998. Signals from the B lymphocyte antigen receptor regulate MHC class II containing late endosomes. *J.Immunol.* 160:5203-5208.
32. Lankar, D., H. Vincent-Schneider, V. Briken, T. Yokozeki, G. Raposo, and C. Bonnerot. 2002. Dynamics of major histocompatibility complex class II compartments during B cell receptor-mediated cell activation. *J.Exp.Med.* 195:461-472.
33. Santambrogio, L., A. K. Sato, G. J. Carven, S. L. Belyanskaya, J. L. Strominger, and L. J. Stern. 1999. Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:15056-15061.
34. Thery, C. and S. Amigorena. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr.Opin.Immunol.* 13:45-51.
35. Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787.
36. Pierre, P., S. J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R. M. Steinman, and I. Mellman. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388:787-792.
37. Alfonso, C., G. S. Williams, and L. Karlsson. 2003. H2-O influence on antigen presentation in H2-E-expressing mice. *Eur.J.Immunol.* 33:2014-2021.

38. Lampson, L. A. and R. Levy. 1980. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J.Immunol.* 125:293-299.
39. Panina-Bordignon, P., X. Fu, A. Lanzavecchia, and R. W. Karr. 1992. Identification of HLA-DR  $\alpha$  chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen. *J.Exp.Med.* 176:1779-1784.
40. Khalil, H., F. Deshaies, A. Bellemare-Pelletier, A. Brunet, A. Faubert, G. A. Azar, and J. Thibodeau. 2002. Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60:372-382.
41. Denzin, L. K., N. F. Robbins, C. Carboy-Newcomb, and P. Cresswell. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1:595-606.
42. Glazier, K. S., S. B. Hake, H. M. Tobin, A. Chadburn, E. J. Schattner, and L. K. Denzin. 2002. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J.Exp.Med.* 195:1063-1069.
43. Lamarche, N., B. Massie, M. Richer, H. Paradis, and Y. Langelier. 1990. High level expression in 293 cells of the herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase subunit 2 using an adenovirus vector. *J.Gen.Virol.* 71 ( Pt 8):1785-1792.
44. Ogorelkova, M., S. M. Elahi, D. Gagnon, and B. Massie. 2004. DNA delivery to cells in culture: generation of adenoviral libraries for high-throughput functional screening. *Methods Mol.Biol.* 246:15-27.

45. He, T. C., S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 95:2509-2514.
46. Lapointe, R., A. Bellemare-Pelletier, F. Housseau, J. Thibodeau, and P. Hwu. 2003. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res.* 63:2836-2843.
47. Lapointe, R., R. E. Royal, M. E. Reeves, I. Altomare, P. F. Robbins, and P. Hwu. 2001. Retrovirally transduced human dendritic cells can generate T cells recognizing multiple MHC class I and class II epitopes from the melanoma antigen glycoprotein 100. *J.Immunol.* 167:4758-4764.
48. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* 179:1109-1118.
49. Engleman, E. G. 2003. Dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Semin.Oncol.* 30:23-29.
50. Mommaas, A. M., A. A. Mulder, R. Jordens, C. Out, M. C. Tan, P. Cresswell, P. M. Kluin, and F. Koning. 1999. Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur.J.Immunol.* 29:571-580.

51. Crystal, R. G. 1999. In vivo and ex vivo gene therapy strategies to treat tumors using adenovirus gene transfer vectors. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 43:S90-S99.
52. Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323.
53. Wickham, T. J., P. Mathias, D. A. Cheresch, and G. R. Nemerow. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73:309-319.
54. Qi, L. and S. Ostrand-Rosenberg. 2001. H2-O inhibits presentation of bacterial superantigens, but not endogenous self antigens. *J.Immunol.* 167:1371-1378.
55. Miyazaki, T., P. Wolf, S. Tourne, C. Waltzinger, A. Dierich, N. Barois, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1996. Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 84:531-541.
56. Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J.Exp.Med.* 188:2357-2368.
57. Pardoll, D. M. and S. L. Topalian. 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 10:588-594.



58. Topalian, S. 1994. MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy. *Curr.Opin.Immunol.* 6:741-745.
59. Sanderson, S., K. Frauwirth, and N. Shastri. 1995. Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:7217-7221.
60. Van Bergen, J., S. P. Schoenberger, F. Verreck, R. Amons, R. Offringa, and F. Koning. 1997. Efficient loading of HLA-DR with a T helper epitope by genetic exchange of CLIP. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:7499-7502.
61. Ostrand-Rosenberg, S., B. A. Pulaski, V. K. Clements, L. Qi, M. R. Pipeling, and L. A. Hanyok. 1999. Cell-based vaccines for the stimulation of immunity to metastatic cancers. *Immunol.Rev.* 170:101-114.
62. Qiu, G., J. Goodchild, R. E. Humphreys, and M. Xu. 1999. Cancer immunotherapy by antisense suppression of Ii protein in MHC-class-II-positive tumor cells. *Cancer Immunol.Immunother.* 48:499-506.
63. Lightstone, L., R. Hargreaves, G. Bobek, M. Peterson, G. Aichinger, G. Lombardi, and R. Lechler. 1997. In the absence of the invariant chain, HLA-DR molecules display a distinct array of peptides which is influenced by the presence or absence of HLA-DM. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:5772-5777.

64. Nanda, N. K. and A. J. Sant. 2000. DM determines the cryptic and immunodominant fate of T cell epitopes. *J.Exp.Med.* 192:781-788.
65. Blum, J. S., C. Ma, and S. Kovats. 1997. Antigen-presenting cells and the selection of immunodominant epitopes. *Crit Rev.Immunol.* 17:411-417.
66. Lally, K. M., S. Mocellin, G. A. Ohnmacht, M. B. Nielsen, M. Bettinotti, M. C. Panelli, V. Monsurro, and F. M. Marincola. 2001. Unmasking cryptic epitopes after loss of immunodominant tumor antigen expression through epitope spreading. *Int.J.Cancer* 93:841-847.
67. Bezwoda, W. R., L. Seymour, and R. D. Dansey. 1995. High-dose chemotherapy with hematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer: a randomized trial. *J.Clin.Oncol.* 13:2483-2489.
68. Jones, R. J., R. F. Ambinder, S. Piantadosi, and G. W. Santos. 1991. Evidence of a graft-versus-lymphoma effect associated with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 77:649-653.
69. Takvorian, T., G. P. Canellos, J. Ritz, A. S. Freedman, K. C. Anderson, P. Mauch, N. Tarbell, F. Coral, H. Daley, and B. Yeap. 1987. Prolonged disease-free survival after autologous bone marrow transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma with a poor prognosis. *N.Engl.J.Med.* 316:1499-1505.
70. Hess, A. D. and C. J. Thoburn. 1997. Immunobiology and immunotherapeutic implications of syngeneic/autologous graft-versus-host disease. *Immunol.Rev.* 157:111-123.

71. Hess, A. D., E. C. Bright, C. Thoburn, G. B. Vogelsang, R. J. Jones, and M. J. Kennedy. 1997. Specificity of effector T lymphocytes in autologous graft-versus-host disease: role of major histocompatibility complex class II invariant chain peptide. *Blood* 89:2203-2209.
72. Taxman, D. J., D. E. Cressman, and J. P. Ting. 2000. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer. *J.Immunol.* 165:1410-1416.
73. Landmann, S., A. Muhlethaler-Mottet, L. Bernasconi, T. Suter, J. M. Waldburger, K. Masternak, J. F. Arrighi, C. Hauser, A. Fontana, and W. Reith. 2001. Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J.Exp.Med.* 194:379-391.
74. Schumacher, L., A. Ribas, V. B. Dissette, W. H. McBride, B. Mukherji, J. S. Economou, and L. H. Butterfield. 2004. Human dendritic cell maturation by adenovirus transduction enhances tumor antigen-specific T-cell responses. *J.Immunother.* 27:191-200.
75. Rea, D., F. H. Schagen, R. C. Hoeben, M. Mehtali, M. J. Havenga, R. E. Toes, C. J. Melief, and R. Offringa. 1999. Adenoviruses activate human dendritic cells without polarization toward a T-helper type 1-inducing subset. *J.Virol.* 73:10245-10253.
76. Marten, A., C. Ziske, B. Schottker, S. Weineck, S. Renoth, P. Buttgereit, F. Schakowski, S. Konig, A. von Rucker, A. Allera, R. Schroers, T. Sauerbruch, B. Wittig, and I. G. Schmidt-Wolf. 2001.

Transfection of dendritic cells (DCs) with the CIITA gene: increase in immunostimulatory activity of DCs. *Cancer Gene Ther.* 8:211-219.

77. Hillman, G. G., N. L. Kallinteris, J. Li, Y. Wang, X. Lu, Y. Li, S. Wu, J. L. Wright, P. Slos, J. V. Gulfo, R. E. Humphreys, and M. Xu. 2003. Generating MHC Class II+/li- phenotype after adenoviral delivery of both an expressible gene for MHC Class II inducer and an antisense li-RNA construct in tumor cells. *Gene Ther.* 10:1512-1518.
78. Mellman, I., S. J. Turley, and R. M. Steinman. 1998. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol.* 8:231-237.
79. Guernonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 20:621-667.
80. Perrin-Cocon, L. A., C. L. Villiers, J. Salamero, F. Gabert, and P. N. Marche. 2004. B cell receptors and complement receptors target the antigen to distinct intracellular compartments. *J.Immunol.* 172:3564-3572.

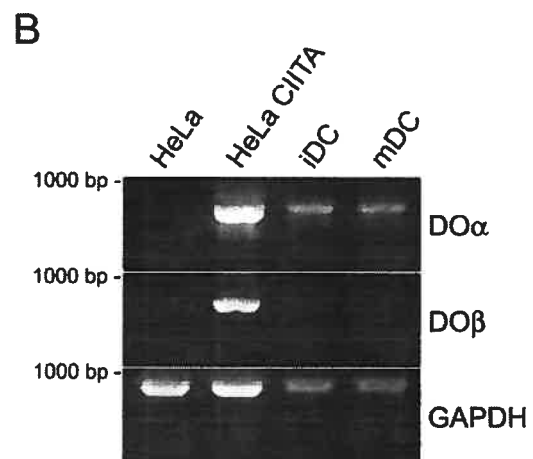
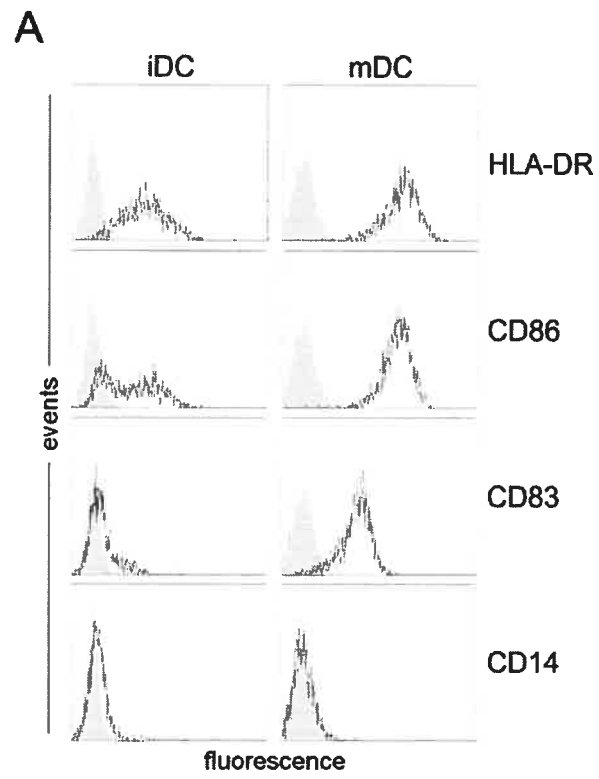
**Figure 1**

Figure 2

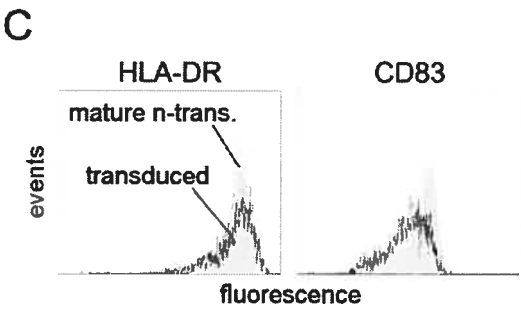
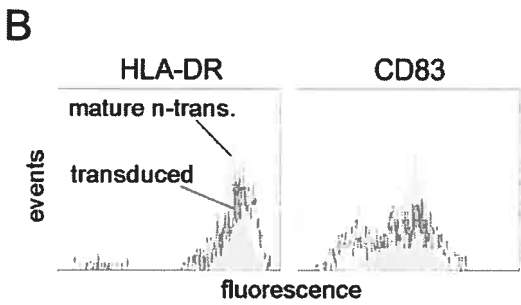
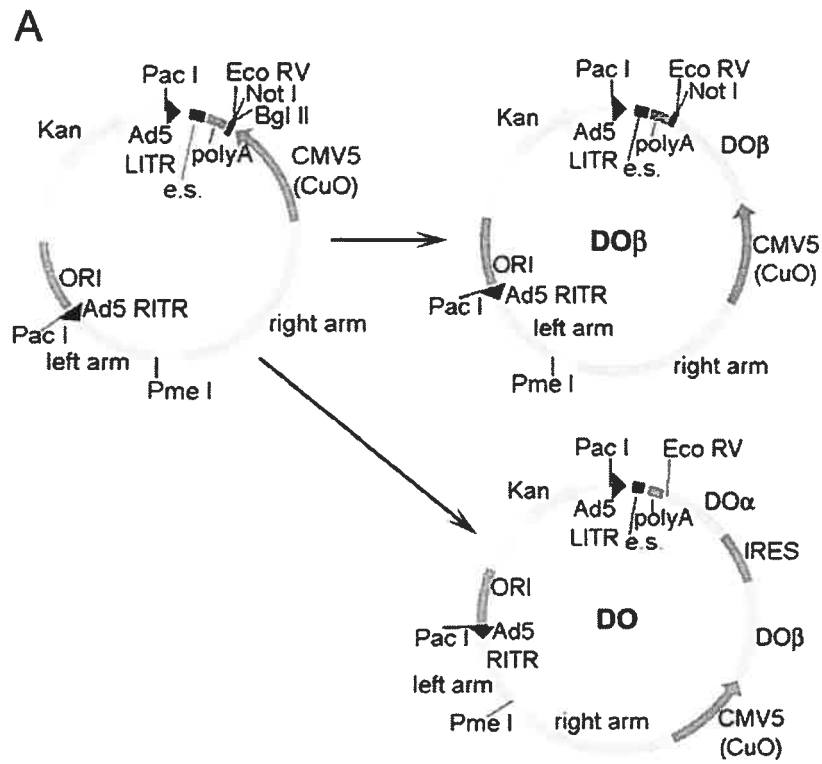
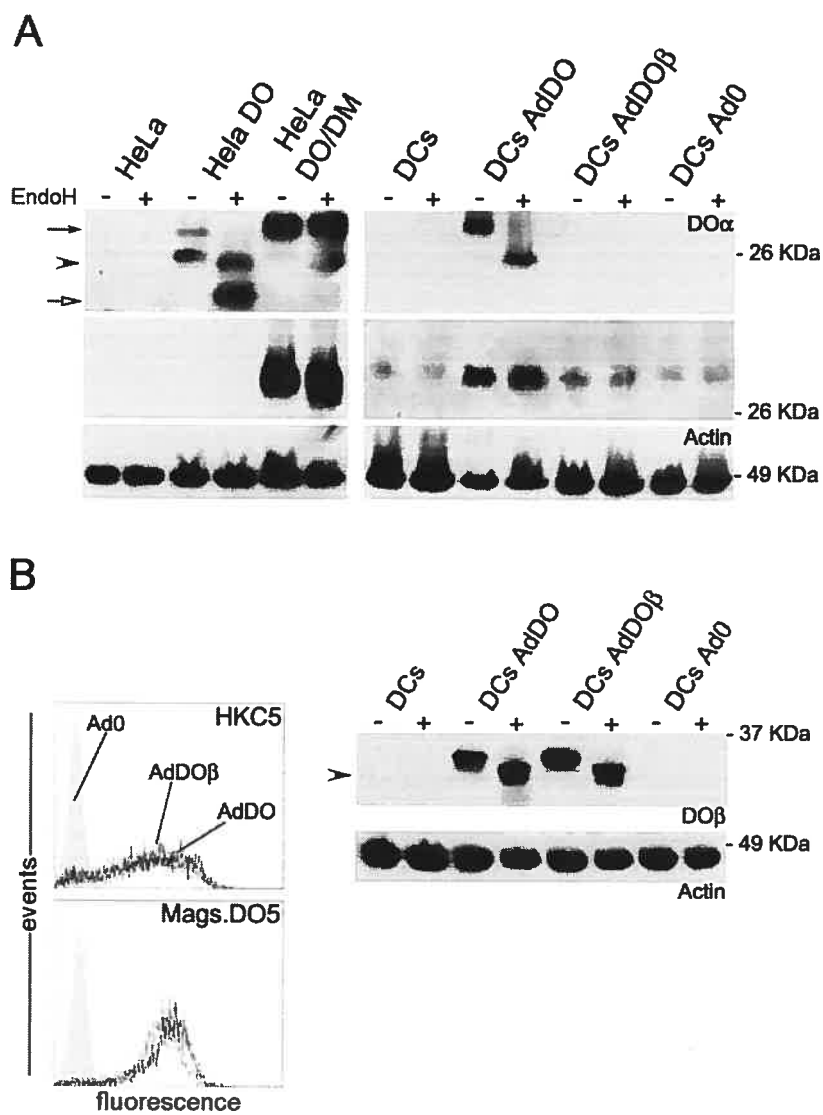


Figure 3



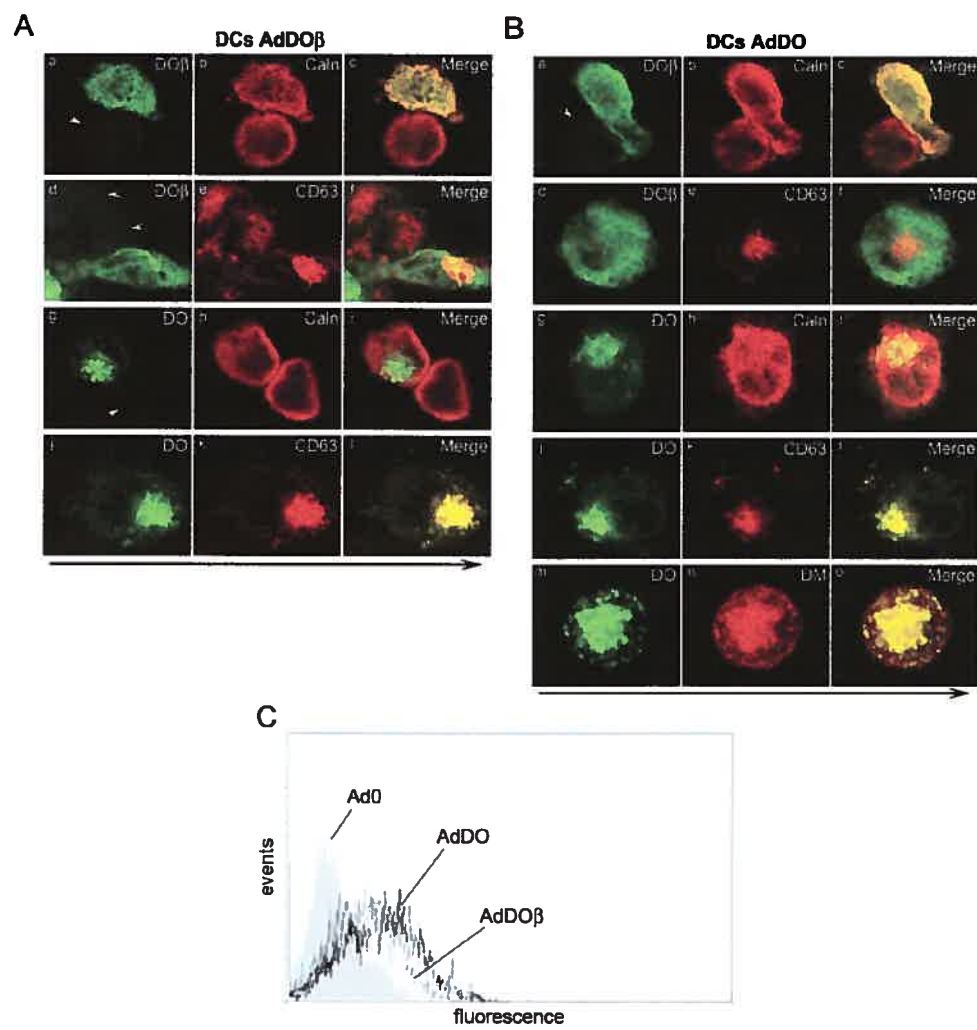
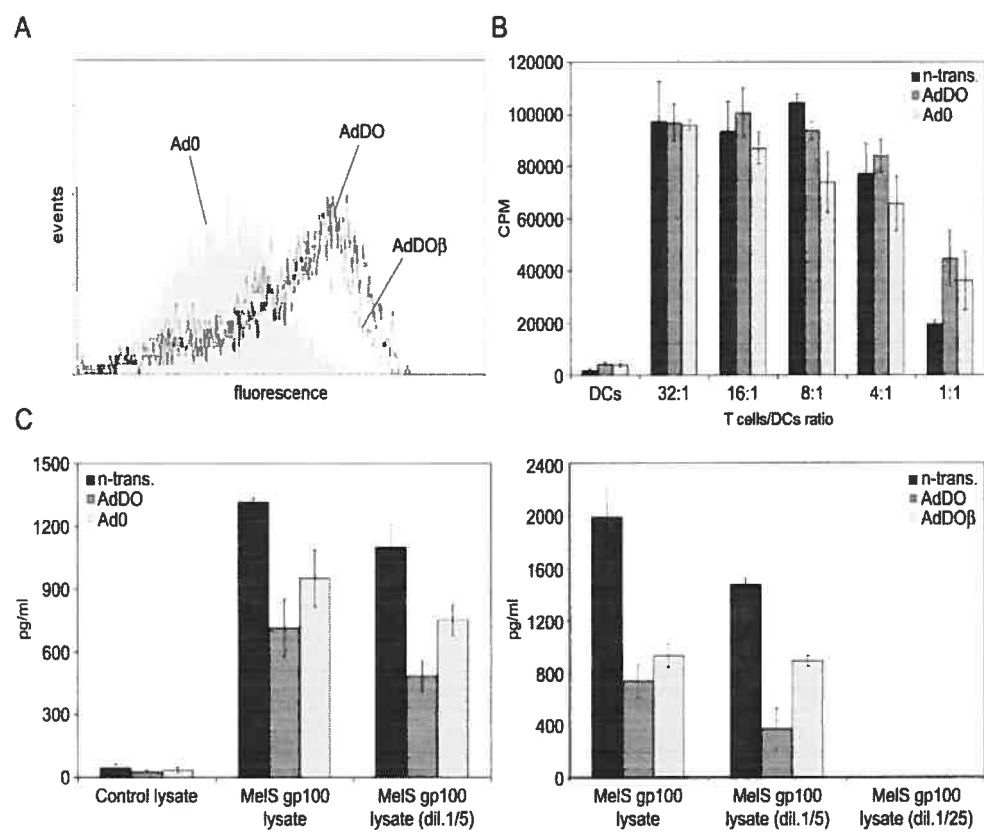
**Figure 4**



Figure 5



## **CHAPITRE 3; DISCUSSION**

### 3.0 HYPOTHÈSE

Dans la section précédente, nous avons tenté de répondre à l'hypothèse selon laquelle la molécule du CMH II non classique HLA-DO, exprimée dans les lymphocytes B, agirait de façon similaire dans les cellules dendritiques (CD) qui en sont dépourvues. Plus spécifiquement, nous cherchions à déterminer si la molécule occasionnerait le même effet modulateur sur le répertoire antigénique dans ces cellules. Ces interrogations ont pu être résolues par le biais des résultats décrits plus hauts (Chapitre 2, section 2.5) et qui seront discutés dans les prochaines lignes. De plus nous analyserons la possibilité d'immunothérapie utilisant les CD DO<sup>+</sup>.

### 3.1 UTILISATION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES DÉRIVÉES DE MONOCYTES

Les cellules dendritiques dérivées de monocytes offrent de grands avantages quant à la facilité d'isolation, de culture et de manipulation *in vitro*. De plus, elles permettent l'obtention des deux phénotypes, c'est à dire les CD immatures (CDi) et matures (CDm). Finalement, ces cellules sont souvent utilisées en immunothérapie (123).

Le taux élevé de molécules du CMH II (HLA-DR) qu'on retrouve à la surface des CDm obtenues après traitement au LPS, vient du fait que les protéines synthétisées *de novo* (discuté dans le chapitre 1) atteignent la surface et ne sont plus internalisées (Chapitre 2, figure 1). Par ailleurs, les CDm expriment un niveau élevé de molécules costimulatrices (CD86). Nous travaillons donc avec un outil apte à l'activation des cellules T et à la présentation antigénique par le CMH II.

Récemment, la modulation de l'activité de H2-M dans les CD murines a été observée en utilisant des souris transgéniques exprimant la molécule DO humaine (165). Puisqu'il existe des différences significatives dans l'organisation et la fonction de la voie endocytaire entre différentes espèces (138,139), il était important de mettre en évidence l'activité potentielle de DO dans les CD humaines. D'abord, nous avons démontré que la molécule est bien exprimée dans les CD humaines et qu'elle inhibe DM comme dans les cellules B. En conséquence, la molécule DO agit considérablement sur la sortie de CLIP en surface, mais ne montre pas d'effet marqué sur la présentation d'antigènes endogènes dans les réactions lymphocytaires mixtes (MLR ou mixed lymphocyte reaction) (Chapitre 2, figure 5). D'ailleurs, les résultats de ces MLR sont en accord avec des essais semblables réalisés dans les CD des souris transgéniques pour DO et dans d'autres systèmes utilisant des cellules murines (108,109,165). Tout semble donc démontrer que DO joue le même rôle dans tous les systèmes.

### **3.2 CHOIX DE L'ADÉNOVIRUS COMME VECTEUR DE TRANSFERT**

Comme expliqué plus haut, l'utilisation de l'adénovirus pour l'introduction de gènes dans les CD était un choix réfléchi puisque ces cellules ne sont pas transfectables à l'aide des techniques communes (voir chapitre 1). Toutefois, les CD sont peu permissives à l'entrée du virus (Chapitre 2, figure 3). Pour arriver à transduire la majorité des CD tout en évitant une toxicité occasionnée par une trop grande charge virale, nous avons tenté d'optimiser la multiplicité d'infection (MOI). Ainsi, entre de MOI de 250 et 1000, les CD restent viables et fonctionnelles. Pour des raisons pratiques, nous avons utilisé la plus basse MOI possible. Cependant, même dans ces conditions, DO est fortement exprimée et en excès dans les CD (discuté plus bas). Par

contre, nous savons que la transduction des CD n'est pas homogène, certaines cellules se retrouvant plus infectées que d'autres. Nous pourrions arriver à uniformiser la transduction en forçant le contact avec l'adénovirus, c'est à dire en l'incubant avec le moins de cellules possible dans le plus petit volume possible. L'incubation serait d'autant plus efficace en y ajoutant un mouvement rotatoire.

Par ailleurs, les CD transduites avec un adénovirus recombinant (dans ce cas AdDO $\beta$ ) montrent les indices d'une maturation partielle. En effet, la transduction des CDi occasionne une augmentation de CD83 (marqueur de maturation des CD) (Chapitre 2, figure 2). Néanmoins, cette maturation n'était pas un obstacle à nos expériences puisque nous devions travailler avec des cellules matures pour la caractérisation biochimique et l'immunofluorescence. Nous obtenions des CD complètement matures en ajoutant le LPS au moment ou après la transduction. Pour les MLR et la présentation de gp100, il était primordial d'élaborer une démarche de transduction adéquate pour éviter la maturation au moment de l'internalisation, celle-ci étant dépendante du stade de maturation des CD (voir chapitre 1 et discuté plus bas).

### **3.3 LE COMPORTEMENT DE HLA-DO DANS LES CELLULES DENDRITIQUES**

La présence de molécules DO endogènes dans les CD est restée longtemps controversée (94,95,166). Nos résultats confirment hors de tout doute que les CD n'expriment pas DO. En effet, nous avons démontré que ces cellules transcrivent seulement l'ARN messager (ARNm) codant pour la chaîne  $\alpha$  (Chapitre 2, figure 1). Nous ne détectons d'ailleurs pas cette chaîne au niveau protéique puisque

l'ARNm a une très courte demi-vie et l'absence de la chaîne  $\beta$  empêche la formation de molécules stables (Chapitre 2, figure 3) (100). Pour que les CD expriment DO, nous avons d'abord transduit seulement la chaîne  $\beta$  pour former des molécules stables avec la chaîne  $\alpha$  endogène. Par la suite, pour maximiser le taux d'expression, nous avons introduit les deux chaînes simultanément.

Cependant, dans notre système, la chaîne DO $\beta$  est exprimée en excès dans les CD, comme le témoignent la grande quantité de chaînes  $\beta$  sensibles à l'endoglycosidase H (EndoH) (Chapitre 2, figure 3) et leur colocalisation avec la calnexine (un marqueur du RE) en microscopie à fluorescence (Chapitre 2, figure 4). En parallèle, même lorsque les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont transduites, la chaîne  $\beta$  se trouve toujours en surplus. De plus, l'augmentation de CLIP retrouvée à la surface des cellules transduites avec les deux chaînes n'est que légèrement plus élevée par rapport aux cellules transduites avec la chaîne  $\beta$  seule (Chapitre 2, figure 5). Tous ces faits confirment que ce n'est pas la chaîne  $\alpha$  qui est limitante mais plutôt DM. Nous avons vu dans le chapitre 1 que la maturation des CD, même incomplète, peut résulter en l'arrêt de transcription de CIITA et donc de la molécule DM (146). Ceci expliquerait donc pourquoi dans notre système, la quantité de DM disponible pour interagir avec DO est faible.

Par contre, même dans ces conditions, l'augmentation du taux de CLIP à la surface des CD confirme en partie que DO agit de façon négative sur DM (Chapitre 2, figure 3). Son activité de régulation de DM s'apparente donc à la fonction retrouvée dans les lymphocytes B. Les analyses de microscopie à fluorescence ont renforcé cette conclusion. Nos observations ont montré que DO se retrouve dans les compartiments endosomiques et colocalise avec DM (Chapitre 2, figure

4). Il est donc probable que la molécule sorte du RE en se liant à DM qui la mène dans les endosomes.

### **3.4 L'EFFET DE HLA-DO SUR LA PRÉSENTATION D'ANTIGÈNES TUMORAUX**

Il a déjà été proposé que l'inhibition de H2-M par H2-O chez la souris prévient la présentation d'Ag internalisés par endocytose en phase fluide dans les endosomes précoces (109). Puisque les CDi sont très efficaces pour la capture d'Ag, il est facile d'imaginer un rôle possible de DO sur la modulation de la présentation d'Ag exogènes. Or, nous avons démontré que la molécule occasionne une baisse de présentation de l'Ag exogène gp100, une protéine modèle surexprimée dans les mélanomes et utilisable en immunothérapie. (Chapitre 2, figure 5). Ce résultat est d'ailleurs en accord avec nos observations faites auparavant démontrant que chez les cellules B stimulées avec CD40L, la molécule DO est régulée à la baisse et la présentation de l'Ag tumoral gp100 s'en trouvait augmentée (2).

Cependant, comme cité au chapitre 1, la molécule DO n'influence pas seulement de façon négative la présentation antigénique. Certains épitopes requièrent même son expression pour être présentés (115). On peut donc se demander quel effet aurait DO sur la présentation d'autres Ag tumoraux. Par exemple, la tyrosinase, une enzyme qui catalyse par oxydation la production de mélanine à partir de la tyrosine, est exprimée dans les mélanocytes. Toutefois les dérivés malins de ces derniers, les mélanomes, expriment des formes inactives de la protéine qui s'accumulent dans le RE (167). Il s'agit donc d'une cible de choix pour monter une réponse anti-tumorale. Par contre, cet Ag n'est pas naturellement présenté par les CD dans le contexte du CMH II, peut-

être parce que les peptides générés sont de faible affinité et que DM les enlève continuellement des molécules du CMH II. Aussi, il est possible que les mélanomes ne permettent pas la glycolysation (acquisition de sucres complexes) adéquate de la tyrosinase, requise pour sa reconnaissance par les cellules T CD4<sup>+</sup> (168). Cette reconnaissance contribuerait d'ailleurs grandement à l'augmentation de la réponse anti-mélanomes. En admettant que la molécule DO occasionne effectivement un remaniement du répertoire antigénique dans les CD, il serait intéressant de tester si des épitopes de la tyrosinase peuvent être présentés aux cellules T CD4<sup>+</sup> par les CD DO<sup>+</sup>. Il serait donc intéressant d'analyser la présentation de cet Ag dans les CD exprimant DO.

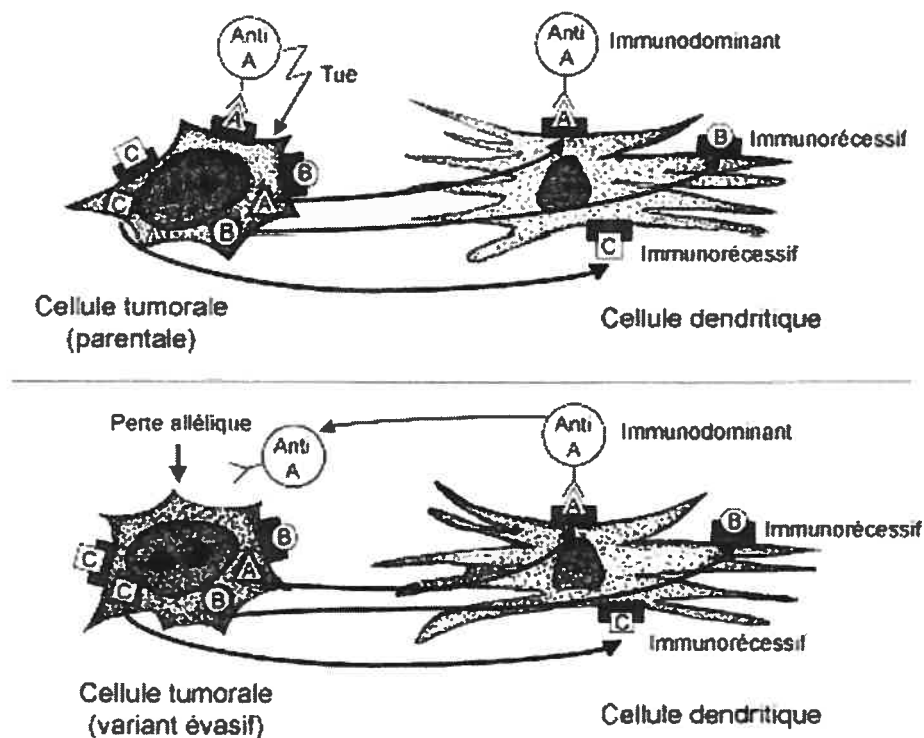
### **3.5 UTILITÉ DE HLA-DO DANS LES CELLULES DENDRITIQUES**

Tel que nous l'avons vu précédemment, les CD sont de très importants intermédiaires dans la défense contre les pathogènes et les tumeurs. De par la présentation antigénique via le CMH de classe II, elles contribuent à l'activation d'effecteurs nécessaires à l'élaboration d'une réponse immunitaire efficace et possèdent cette capacité unique d'initier des réponses immunitaires primaires (169,170). D'autre part, comme cité plus haut, elles sont déjà grandement utilisées dans les immunothérapies contre le cancer (123). La manipulation de leur machinerie de présentation antigénique offre un avantage intéressant pour le développement de tels protocoles. La molécule DM est d'ailleurs une cible de choix à modifier puisqu'elle est en lien directe dans l'élaboration du répertoire de peptides présenté par les CD. Comme on l'a déjà vu, la molécule DM catalyse l'enlèvement de CLIP de la poche peptidique des molécules du CMH II pour laisser la place à des peptides antigéniques de haute affinité. En modifiant cette activité de DM, on



pourrait arriver à changer le répertoire peptidique, favorisant la présentation de peptides cryptiques (sous-dominants). Habituellement, les réponses immunologiques sont dirigées contre des peptides qualifiés d'immunodominants. Ceux-ci constituent seulement une petite fraction de l'ensemble des peptides générés par la protéolyse des antigènes. Ils sont toujours favorisés au chargement par DM parce qu'ils sont adéquatement digérés et ont une forte affinité pour les molécules du CMH II (171,172). Alors que les autres peptides restent cachés et ne sont jamais présentés. D'ailleurs, plusieurs tumeurs réussissent à s'évader du système immunitaire en diminuant la présentation des épitopes immunodominants (173) [Figure 3.1]. L'apparition des épitopes cryptiques dans le répertoire antigénique pourrait avoir une implication importante dans le développement de stratégies d'immunisation. Dans ce contexte, la molécule DO, qui est un modulateur naturel de DM dans les lymphocytes B, pourrait être utilisé pour réguler cette molécule dans des CD chargées avec des Ag tumoraux. Puisqu'il a déjà été établi que DO peut augmenter la présentation de certains peptides (109,115), il serait possible que des épitopes cryptiques soient favorisés au chargement sur les molécules du CMH II. Ceci aurait comme conséquence d'activer des cellules T capables de reconnaître des tumeurs exprimant des taux très faibles de ces épitopes. Ainsi, par ses activités immunomodulatrices, la molécule DO contribuerait à la variété des immunothérapies ou des stratégies de vaccination utilisant les CD.

En parallèle, comme nous l'avons déjà mentionné, aucun changement n'a été observé dans les alloréponses impliquant des CD exprimant DO d'un donneur et les cellules T d'un donneur différent. Ces réactions sont causées par la reconnaissance de molécules du CMH II étrangères associées à des peptides endogènes naturels (174).



**Figure 3.1 L'Évasion tumorale par la perte d'épitopes immunodominants.** Ces épitopes sont abondants et de haute affinité et sont favorisés à être présentés par les molécules du CMH II, au détriment des épitopes immunorécessifs qui restent cryptiques. Les cellules tumorales peuvent s'évader du système immunitaire en diminuant l'expression de ces épitopes, empêchant leur présentation aux cellules T et l'élaboration d'une réponse anti-tumeur.

(Adapté de Schreiber, H. & al. *Semin. Cancer Biol.* 2002) (173)

Nous aurions pu nous attendre à des variations à la hausse ou à la baisse de la réponse à cause de l'effet modulateur de DO sur la présentation antigénique, ne serait-ce que sur l'échange du peptide CLIP. Il n'est toutefois pas impossible de penser qu'avec d'autres

couples de donneurs la réponse aurait différé en raison de la variété allélique de chaque individu. De plus, il se peut que dans nos expériences DO n'ait favorisé ni à la hausse ni à la baisse la présentation générale des peptides endogènes, mais peut-être a-t-il simplement occasionné un échange du répertoire pour un autre tout aussi bien reconnu par les cellules T. Ce changement ne pourrait donc pas se refléter dans une alloréponse de type *MLR*. Dans ce cas, il serait intéressant de comparer le répertoire de peptides des CD matures normales à celui des CD exprimant DO pour en analyser les variations qualitatives (175). Ceci pourrait être rendu possible par l'élution des peptides liés sur les molécules du CMH II et leur analyse par la technique de HPLC (*high pressure liquid chromatography*) qui permet de séparer les peptides selon leur hydrophobicité ou leur charge ionique. Ensuite, pour les identifier, on a recours à la spectroscopie de masse en tandem (MS/MS). Elle combine la séparation des peptides selon leur masse et l'analyse de leur séquence d'acides aminés (176,177).

Il est facile d'imaginer que la molécule DO puisse aussi influencer la présentation antigénique des CD dans d'autres circonstances. Comme nous l'avons déjà vu, le processus de présentation antigénique par le CMH de classe II diffère d'un type de CPA à l'autre. Dans le cas des CD, l'apprêtement et le chargement antigénique peuvent même se faire à la surface cellulaire (84,85). Nous avons aussi démontré qu'une quantité appréciable de DO accédait à la surface des CD (Chapitre 2, figure 4). La molécule pourrait donc influencer le répertoire antigénique par son activité régulatrice sur DM en surface, en plus de son activité interne.

## **CHAPITRE 4; CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Dans le présent travail, nous avons caractérisé la voie de présentation antigénique par le CMH de classe II utilisée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les attributs des différents joueurs mis en cause dans ce processus ont été passés en revue, particulièrement ceux de HLA-DO, une molécule du CMH II non classique impliquée dans la modulation du répertoire antigénique. Nous avons aussi dépeint les propriétés des cellules dendritiques (CD), un type de CPA unique capable de présenter des antigènes aux cellules T naïves. Nous y avons fait exprimer DO dans le but de mieux cerner cette protéine dans le contexte d'un système cellulaire qui ne l'exprime habituellement pas. D'ailleurs, les résultats décrits plus haut auront contribué à éclaircir un peu plus ses fonctions. Par son influence sur DM et indirectement sur le répertoire peptidique, nous avons observé que la molécule semble fonctionner de la même façon dans les CD que dans les lymphocytes B. Cependant, il n'est pas impossible que DO acquière de nouvelles propriétés dans d'autres types de CPA puisque que chacun d'eux utilise une machinerie de présentation antigénique différente et unique. Des travaux subséquents devront donc se faire afin d'approfondir la caractérisation de notre système.

D'abord, nous devons voir à minimiser l'excès de chaînes DO $\beta$  dans les CD pour éviter la toxicité. Même si les cellules semblent fonctionnelles, il est possible que ce surplus corresponde à une saturation de la synthèse protéique. Ceci aurait pour effet d'emprisonner les nouvelles protéines dans le RE (d'où la forte colocalisation avec la calnexine en microscopie à fluorescence).

Dans un autre ordre d'idées, nos résultats montrent par déduction que DO se lie à DM par l'augmentation de CLIP en surface et la colocalisation dans les mêmes compartiments. Nous devrions réaliser

une immunoprécipitation (IP) utilisant l'anti-DM $\beta$  révélée ensuite en « western blot » avec l'anti-DO $\alpha$  pour s'assurer de cette liaison. Par ailleurs, puisqu'il semble y avoir une faible quantité de DM pour lier toutes les molécules DO transduites, nous pourrions aussi effectuer un marquage métabolique suivi d'une chasse des molécules DM pour suivre ses variations d'expression dans le temps après la transduction des CD.

Tel que mentionné plus haut, la maturation des CD au moment de la transduction a pu occasionné une chute de transcription du gène codant pour CIITA. Nous pourrions vérifier ce fait par le biais d'une analyse de l'ARNm en RT-PCR dans les CDi transduites versus les CDi non-transduites. Aussi, pour éviter la chute d'expression des molécules de présentation antigénique par le manque de CIITA et maximiser la quantité de molécules DO actives, nous pourrions utiliser l'adénovirus codant pour les chaînes DO $\alpha$  et DO $\beta$ , mais dans lequel on remplacerait la chaîne  $\alpha$  par CIITA. Ainsi, toutes les molécules seraient exprimées simultanément et en plus grand nombre.

Dans le cas des expériences de présentation de peptides tumoraux (gp100), notre stratégie pour éviter la maturation des CD au moment de l'apprêtement antigénique et du chargement peptidique semblait adéquate. En effet, nous prenions soin d'administrer le lysat juste après les deux jours d'incubation nécessaires à la transduction. Après une dizaine d'heures, nous ajoutons le LPS pour compléter la maturation. Pour maximiser l'internalisation, nous aurions pu introduire le lysat après seulement une journée de transduction. À ce moment, la synthèse de DO devrait déjà avoir débuté. Ensuite, afin d'optimiser la présentation de l'épitope reconnu par le clone T spécifique à gp100, nous devrions charger les CD avec le peptide purifié. Ceci ferait en

sorte d'éviter la compétition pour les molécules du CMH II entre les peptides générés par la protéolyse de la protéine gp 100 entière.

Nous pouvons donc constater qu'il reste un grand bout de chemin à faire avant d'en arriver à l'élaboration d'immunothérapies mettant en vedette les CD exprimant DO. Cette approche augmenterait l'efficacité de l'immunité anti-tumorale par l'apport des cellules T CD4<sup>+</sup> dans les réponses, rajoutant leurs efforts à ceux des cellules T CD8<sup>+</sup>. Il faut toutefois prendre en compte la possibilité que la révélation d'un répertoire cryptique par DO dans les CD mène à l'éveil d'épitopes autoimmunitaires (178). Il faudra donc peser dans la balance les effets bénéfiques par rapport et aux effets néfastes de l'approche. Le fait de connaître parfaitement les nouveaux peptides présentés par le APC (par les méthodes citées plus haut) sera d'une grande importance.

Finalement, l'expression de la molécule DO dans les CD, constituerait une approche nouvelle et originale contribuant à la variété des protocoles de lutte contre des maladies comme la cancer.

## **CHAPITRE 5; RÉFÉRENCES**



1. Khalil, H., F. Deshaies, A. Bellemare-Pelletier, A. Brunet, A. Faubert, G. A. Azar, and J. Thibodeau. 2002. Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60:372-382.
2. Lapointe, R., A. Bellemare-Pelletier, F. Housseau, J. Thibodeau, and P. Hwu. 2003. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res.* 63:2836-2843.
3. Pieters, J. 1997. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* 9:89-96.
4. Germain, R. N. 1994. MHC-dependant antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-299.
5. Vignali, D. A. 1994. The interaction between CD4 and MHC class II molecules and its effect on T cell function. *Behring Inst.Mitt.* 133-147.
6. Watts, C. 1998. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 15:821-850.
7. Beck, S. and J. Trowsdale. 2000. The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 1:117-137.

8. Chang, C.-H., J. D. Fontes, M. Peterlin, and R. A. Flavell. 1994. Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J.Exp.Med.* 180:1367-1374.
9. Steimle, V., C.-A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre, and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106-109.
10. Ting, J. P. and J. Trowsdale. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl:S21-S33.
11. Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: Lessons from a disease. *Annu.Rev.Immunol.* 14:301-331.
12. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
13. Knight, S. C. and A. J. Stagg. 1993. Antigen-presenting cell types. *Curr.Opin.Immunol.* 5:374-382.
14. Giacomini, P., P. B. Fisher, G. J. Duigou, R. Gambari, and P. G. Natali. 1988. Regulation of class II MHC gene expression by interferons: insights into the mechanism of action of interferon (review). *Anticancer Res.* 8:1153-1161.
15. Glimcher, L. H. and C. J. Kara. 1992. Sequences and factors: A guide to MHC class-II transcription. *Annu.Rev.Immunol.* 10:13-49.

16. Brown, J. H., T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.
17. Kappes, D. and J. L. Strominger. 1988. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 57:991-1028.
18. Konig, R., L.-Y. Huang, and R. N. Germain. 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 356:796-798.
19. Appella, E., E. A. Padlan, and D. F. Hunt. 1995. Analysis of the structure of naturally processed peptides bound by class I and class II major histocompatibility complex molecules. *EXS* 73:105-119.
20. Sinigaglia, F. and J. Hammer. 1995. Motifs and supermotifs for MHC class II binding peptides. *J.Exp.Med.* 181:449-451.
21. Krensky, A. M. 1997. The HLA system, antigen processing and presentation. *Kidney Int.Suppl* 58:S2-S7.
22. Chicz, R. M., R. G. Urban, J. C. Gorga, D. A. A. Vignali, W. S. Lane, and J. L. Strominger. 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J.Exp.Med.* 178:27-47.
23. Hunt, D. F., H. Michel, T. A. Dickinson, J. Shabanowitz, A. L. Cox, K. Sakaguchi, E. Appella, H. M. Grey, and A. Sette. 1992.

Peptides presented to the immune system by murine class II major histocompatibility complex molecule I-A<sup>d</sup>. *Science* 256:1817-1820.

24. Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 12:259-293.
25. Cresswell, P. 1992. Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr.Opin.Immunol.* 4:87-92.
26. Hammerling, G. J. and J. Moreno. 1990. The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol.Today* 11:337-340.
27. Lamb, C. A. and P. Cresswell. 1992. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J.Immunol.* 148:3478-3482.
28. Roche, P. A., M. S. Marks, and P. Cresswell. 1991. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 354:392-394.
29. Marks, M. S., J. S. Blum, and P. Cresswell. 1990. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J.Cell Biol.* 111:839-855.
30. Arunachalam, B. and P. Cresswell. 1995. Molecular requirements for the interaction of class II MHC molecules and invariant chain with calnexin. *J.Biol.Chem.* 270:2784-2790.

31. Anderson, K. S. and P. Cresswell. 1994. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* 13:675-682.
32. Busch, R., I. Cloutier, R.-P. Sekaly, and G. J. Hammerling. 1996. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 15:418-428.
33. Roche, P. A. and P. Cresswell. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615-618.
34. Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-507.
35. Ashman, J. B. and J. Miller. 1999. A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC class II-associated invariant chain. *J. Immunol.* 163:2704-2712.
36. Jasanoff, A., G. Wagner, and D. C. Wiley. 1998. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J.* 17:6812-6818.
37. Benaroch, P., M. Yilla, G. Raposo, K. Ito, K. Miwa, H. J. Geuze, and H. L. Ploegh. 1995. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* 14:37-49.
38. Romagnoli, P. and R. N. Germain. 1994. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major

histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J.Exp.Med.* 180:1107-1113.

39. Bakke, O. and B. Dobberstein. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-716.
40. Bikoff, E. K., L.-Y. Huang, V. Episkopou, J. van Meerwijk, R. N. Germain, and E. J. Robertson. 1993. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J.Exp.Med.* 177:1699-1712.
41. Viville, S., J. J. Neefjes, V. Lotteau, A. Dierich, M. Lemeur, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635-648.
42. Nakagawa, T. Y. and A. Y. Rudensky. 1999. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol.Rev.* 172:121-129.
43. Riese, R. J., P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4:357-366.
44. Maric, M. A., M. D. Taylor, and J. S. Blum. 1994. Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:2171-2175.

45. Roche, P. A. and P. Cresswell. 1991. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:3150-3154.
46. Manoury, B., D. Mazzeo, D. N. Li, J. Billson, K. Loak, P. Benaroch, and C. Watts. 2003. Asparagine endopeptidase can initiate the removal of the MHC class II invariant chain chaperone. *Immunity*. 18:489-498.
47. Ghosh, P., M. Amaya, E. Mellins, and D. C. Wiley. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378:457-462.
48. Riberdy, J. M., J. R. Newcomb, M. J. Surman, J. A. Barbosa, and P. Cresswell. 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360:474-477.
49. Sette, A., S. Ceman, R. T. Kubo, K. Sakaguchi, E. Appella, D. F. Hunt, T. A. Davis, H. Michel, J. Shabanowitz, R. Rudersdorf, H. M. Grey, and R. DeMars. 1992. Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen- processing mutant. *Science* 258:1801-1804.
50. Reich, Z., J. D. Altman, J. J. Boniface, D. S. Lyons, H. Kozono, G. Ogg, C. Morgan, and M. M. Davis. 1997. Stability of empty and peptide-loaded class II major histocompatibility complex molecules at neutral and endosomal pH: Comparison to class I proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:2495-2500.

51. Hitzel, C. and N. Koch. 1996. The invariant chain derived fragment CLIP is an efficient *in vitro* inhibitor of peptide binding to MHC class II molecules. *Mol.Immunol.* 33:25-31.
52. Teyton, L., D. O'Sullivan, P. W. Dickson, V. Lotteau, A. Sette, P. Fink, and P. A. Peterson. 1990. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 348:39-44.
53. Newcomb, J. R. and P. Cresswell. 1993. Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J.Immunol.* 151:4153-4163.
54. Geuze, H. J. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol.Today* 19:282-287.
55. Roche, P. A. 1995. HLA-DM: an in vivo facilitator of MHC class II peptide loading. *Immunity* 3:259-262.
56. Vogt, A. B., H. Kropshofer, H. Kalbacher, M. Kalbus, H.-G. Rammensee, J. E. Coligan, and R. Martin. 1994. Ligand motifs of HLA-DRB5\*0101 and DRB1\*1501 molecules delineated from self-peptides. *J.Immunol.* 153:1665-1673.
57. Neefjes, J. J. and H. L. Ploegh. 1992. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol.Today* 13:179-184.
58. Buus, S., A. Sette, S. M. Colon, D. M. Jenis, and H. M. Grey. 1986. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* 47:1071-1077.



59. Riberty, J. M. and P. Cresswell. 1992. The antigen-processing mutant T2 suggest a role for MHC-linked genes in class II antigen presentation. *J.Immunol.* 148:2586-2590.
60. Mellins, E., S. Kempin, L. Smith, T. Monji, and D. Pious. 1991. A gene required for class II-restricted antigen presentation maps to the major histocompatibility complex. *J.Exp.Med.* 174:1607-1615.
61. Mellins, E., L. Smith, B. Arp, T. Cotner, E. Celis, and D. Pious. 1990. Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* 343:71-74.
62. Denzin, L. K. and P. Cresswell. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155-165.
63. Kropshofer, H., A. B. Vogt, and G. J. Hammerling. 1995. Structural features of the invariant chain fragment CLIP controlling rapid release from HLA-DR molecules and inhibition of peptide binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:8313-8317.
64. Sloan, V. S., P. Cameron, G. Porter, M. Gammon, M. Amaya, E. Mellins, and D. M. Zaller. 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA- DR. *Nature* 375:802-806.
65. Avva, R. R. and P. Cresswell. 1994. In vivo and in vitro formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides. *Immunity.* 1:763-774.

66. Pierre, P., L. K. Denzin, C. Hammond, J. R. Drake, S. Amigorena, P. Cresswell, and I. Mellman. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity* 4:229-239.
67. Carrington, M. and A. Harding. 1994. Sequence analysis of two novel *HLA-DMA* alleles. *Immunogenetics* 40:165.
68. Karlsson, L., A. Péléraux, R. Lindstedt, M. Liljedahl, and P. A. Peterson. 1994. Reconstitution of an operational MHC class II compartment in nonantigen-presenting cells. *Science* 266:1569-1573.
69. Sanderson, F., M. J. Kleijmeer, A. Kelly, D. Verwoerd, A. Tulp, J. J. Neefjes, H. J. Geuze, and J. Trowsdale. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 266:1566-1569.
70. Kelly, A. P., J. J. Monaco, S. Cho, and J. Trowsdale. 1991. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 353:571-573.
71. Cho, S., M. Attaya, and J. J. Monaco. 1991. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* 353:573-576.
72. Hake, S. B., H. M. Tobin, V. Steimle, and L. K. Denzin. 2003. Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes. *Eur.J Immunol* 33:2361-2371.
73. Kern, I., V. Steimle, C. A. Siegrist, and B. Mach. 1995. The two novel MHC class II transactivators RFX5 and CIITA both control expression of HLA-DM genes. *Int.Immunol.* 7:1295-1299.

74. Fremont, D. H., F. Crawford, P. Marrack, W. A. Hendrickson, and J. Kappler. 1998. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* 9:385-393.
75. Mosyak, L., D. M. Zaller, and D. C. Wiley. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9:377-383.
76. Copier, J., M. J. Kleijmeer, S. Ponnambalam, V. Oorschot, P. Potter, J. Trowsdale, and A. Kelly. 1996. Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB. *J. Immunol.* 157:1017-1027.
77. Marks, M. S., P. A. Roche, E. van Donselaar, L. Woodruff, P. J. Peters, and J. S. Bonifacio. 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the  $\beta$  chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J. Cell Biol.* 131:351-369.
78. Denzin, L. K., N. F. Robbins, C. Carboy-Newcomb, and P. Cresswell. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1:595-606.
79. Sanderson, F., C. Thomas, J. Neefjes, and J. Trowsdale. 1996. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity* 4:87-96.
80. Arndt, S. O., A. B. Vogt, S. Markovic-Plese, R. Martin, G. Moldenhauer, A. Wolpl, Y. Sun, D. Schadendorf, G. J. Hammerling, and H. Kropshofer. 2000. Functional HLA-DM on

the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J.* 19:1241-1251.

81. Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 15:821-850.
82. Pinet, V., M. Vergelli, R. Martin, O. Bakke, and E. O. Long. 1995. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA- DR molecules. *Nature* 375:603-606.
83. Pinet, V., M. S. Malnati, and E. O. Long. 1994. Two processing pathways for the MHC class II-restricted presentation of exogenous influenza virus antigen. *J.Immunol.* 152:4852-4860.
84. Piva, T. J., C. M. Davern, K. G. Francis, G. M. Chojnowski, P. M. Hall, and K. A. Ellem. 2000. Increased ecto-metallopeptidase activity in cells undergoing apoptosis. *J.Cell Biochem.* 76:625-638.
85. Santambrogio, L., A. K. Sato, G. J. Carven, S. L. Belyanskaya, J. L. Strominger, and L. J. Stern. 1999. Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:15056-15061.
86. Sherman, M. A., D. A. Weber, and P. E. Jensen. 1995. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 3:197-205.
87. Kovats, S., P. E. Whiteley, P. Concannon, A. Y. Rudensky, and J. S. Blum. 1997. Presentation of abundant endogenous class II

DR-restricted antigens by DM-negative B cell lines.

*Eur.J.Immunol.* 27:1014-1021.

88. Tourne, S., T. Miyazaki, P. Wolf, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1997. Functionality of major histocompatibility complex class II molecules in mice doubly deficient for invariant chain and H-2M complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:9255-9260.
89. Zarutskie, J. A., R. Busch, Z. Zavala-Ruiz, M. Rushe, E. D. Mellins, and L. J. Stern. 2001. The kinetic basis of peptide exchange catalysis by HLA-DM. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:12450-12455.
90. Servenius, B., L. Rask, and P. A. Peterson. 1987. Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DO beta gene is a divergent member of the class II beta gene family. *J.Biol.Chem.* 262:8759-8766.
91. Trowsdale, J. and A. Kelly. 1985. The human HLA class II alpha chain DZ alpha is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO J.* 4:2231-2237.
92. Inoko, H., A. Ando, M. Kimura, and K. Tsuji. 1985. Isolation and characterization of the cDNA clone and genomic clones of a new HLA class II antigen heavy chain, DO alpha. *J.Immunol.* 135:2156-2159.
93. Tonnelie, C., R. DeMars, and E. O. Long. 1985. DO $\beta$ : a new  $\beta$  chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-2847.

94. Douek, D. C. and D. M. Altmann. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int.Immunol.* 9:355-364.
95. Karlsson, L., C. D. Surh, J. Sprent, and P. A. Peterson. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 351:485-488.
96. Chen, X. and P. E. Jensen. 2004. The expression of HLA-DO (H2-O) in B lymphocytes. *Immunol.Res.* 29:19-28.
97. Alfonso, C. and L. Karlsson. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 18:113-142.
98. Chen, X., O. Laur, T. Kambayashi, S. Li, R. A. Bray, D. A. Weber, L. Karlsson, and P. E. Jensen. 2002. Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. *J.Exp.Med.* 195:1053-1062.
99. Taxman, D. J., D. E. Cressman, and J. P. Ting. 2000. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN  $\alpha$ /DO  $\beta$  heterodimer. *J.Immunol.* 165:1410-1416.
100. Trowsdale, J. and A. Kelly. 1985. The Human HLA class II  $\alpha$  chain DZ $\alpha$  is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO J.* 4:2231-2237.
101. Liljedahl, M., T. Kuwana, W. P. Fung-Leung, M. Jackson, P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident

which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15:4817-4824.

102. van Lith, M., M. van Ham, A. Griekspoor, E. Tjin, D. Verwoerd, J. Calafat, H. Janssen, E. Reits, L. Pastoors, and J. Neefjes. 2001. Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *J.Immunol.* 167:884-892.
103. Brunet, A., A. Samaan, F. Deshaies, T. J. Kindt, and J. Thibodeau. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.
104. Samaan, A., J. Thibodeau, W. Mahana, F. Castellino, P. A. Cazenave, and T. J. Kindt. 1999. Cellular distribution of a mixed MHC class II heterodimer between DRa and a chimeric DOβ chain. *Int.Immunol.* 11:99-111.
105. van Ham, M., M. van Lith, B. Lillemeier, E. Tjin, U. Gruneberg, D. Rahman, L. Pastoors, K. van Meijgaarden, C. Roucard, J. Trowsdale, T. Ottenhoff, D. Pappin, and J. Neefjes. 2000. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J.Exp.Med.* 191:1127-1136.
106. Denzin, L. K., D. B. Sant'Angelo, C. Hammond, M. J. Surman, and P. Cresswell. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-109.

107. Van Ham, S. M., E. P. M. Tjin, B. F. Lillemeier, U. Gruneberg, K. E. Van Meijgaarden, L. Pastoors, D. Verwoerd, A. Tulp, B. Canas, D. Rahman, T. H. Ottenhoff, D. J. Pappin, J. Trowsdale, and J. Neefjes. 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7:950-957.
108. Perraudeau, M., P. R. Taylor, H. J. Stauss, R. Lindstedt, A. E. Bygrave, D. J. Pappin, S. Ellmerich, A. Whitten, D. Rahman, B. Canas, M. J. Walport, M. Botto, and D. M. Altmann. 2000. Altered major histocompatibility complex class II peptide loading in H2-O-deficient mice. *Eur.J.Immunol.* 30:2871-2880.
109. Liljedahl, M., O. Winqvist, C. D. Surh, P. Wong, K. Ngo, L. Teyton, P. A. Peterson, A. Brunmark, A. Y. Rudensky, W. P. Fung-Leung, and L. Karlsson. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233-243.
110. Brocke, P., E. Armandola, N. Garbi, and G. J. Hammerling. 2003. Downmodulation of antigen presentation by H2-O in B cell lines and primary B lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 33:411-421.
111. Kropshofer, H., A. B. Vogt, C. Thery, E. A. Armandola, B. C. Li, G. Moldenhauer, S. Amigorena, and G. J. Hammerling. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 17:2971-2981.
112. Chalouni, C., J. Banchereau, A. B. Vogt, V. Pascual, and J. Davoust. 2003. Human germinal center B cells differ from naive and memory B cells by their aggregated MHC class II-rich compartments lacking HLA-DO. *Int.Immunol.* 15:457-466.



113. Glazier, K. S., S. B. Hake, H. M. Tobin, A. Chadburn, E. J. Schattner, and L. K. Denzin. 2002. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J.Exp.Med.* 195:1063-1069.
114. MacLennan, I. C. 1994. Germinal centers. *Annu.Rev.Immunol.* 12:117-139.
115. Alfonso, C., G. S. Williams, J. O. Han, J. A. Westberg, O. Winqvist, and L. Karlsson. 2003. Analysis of H2-O influence on antigen presentation by B cells. *J.Immunol.* 171:2331-2337.
116. Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau, and Y. J. Liu. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J.Exp.Med.* 185:1101-1111.
117. Olweus, J., A. BitMansour, R. Warnke, P. A. Thompson, J. Carballido, L. J. Picker, and F. Lund-Johansen. 1997. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:12551-12556.
118. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* 179:1109-1118.
119. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia, and J. Banchereau. 1997. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate

along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90:1458-1470.

120. Saint-Vis, B., I. Fugier-Vivier, C. Massacrier, C. Gaillard, B. Vanbervliet, S. Ait-Yahia, J. Banchereau, Y. J. Liu, S. Lebecque, and C. Caux. 1998. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J.Immunol.* 160:1666-1676.
121. Stossel, H., F. Koch, E. Kampgen, P. Stoger, A. Lenz, C. Heufler, N. Romani, and G. Schuler. 1990. Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J.Exp.Med.* 172:1471-1482.
122. Hanau, D., M. Fabre, D. A. Schmitt, J. L. Stampf, J. C. Garaud, T. Bieber, E. Grosshans, C. Benezra, and J. P. Cazenave. 1987. Human epidermal Langerhans cells internalize by receptor-mediated endocytosis T6 (CD1 "NA1/34") surface antigen. Birbeck granules are involved in the intracellular traffic of the T6 antigen. *J.Invest Dermatol.* 89:172-177.
123. Engleman, E. G. 2003. Dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Semin.Oncol.* 30:23-29.
124. Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.

125. Miller, M. D. and M. S. Krangel. 1992. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev.Immunol.* 12:17-46.
126. Hart, D. N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-3287.
127. Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J.Exp.Med.* 188:373-386.
128. Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur.J.Immunol.* 28:2760-2769.
129. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J.Exp.Med.* 182:389-400.
130. Inaba, K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K. S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P. S. Linsley, S. Ikehara, and . 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J.Exp.Med.* 180:1849-1860.

131. Bevan, M. J. 1977. Priming for a cytotoxic response to minor histocompatibility antigens: antigen specificity and failure to demonstrate a carrier effect. *J.Immunol.* 118:1370-1374.
132. Bevan, M. J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J.Exp.Med.* 143:1283-1288.
133. Ackerman, A. L., C. Kyritsis, R. Tampe, and P. Cresswell. 2003. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:12889-12894.
134. Guermonprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert, and S. Amigorena. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425:397-402.
135. Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M. F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks, and M. Desjardins. 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425:402-406.
136. Gagnon, E., S. Duclos, C. Rondeau, E. Chevet, P. H. Cameron, O. Steele-Mortimer, J. Paiement, J. J. Bergeron, and M. Desjardins. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110:119-131.
137. Bryant, P. and H. Ploegh. 2004. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr.Opin.Immunol.* 16:96-102.

138. Mellman, I. and R. M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.
139. Thery, C. and S. Amigorena. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr.Opin.Immunol.* 13:45-51.
140. Pierre, P., S. J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R. M. Steinman, and I. Mellman. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388:787-792.
141. Nijman, H. W., M. J. Kleijmeer, M. A. Ossevoort, V. M. J. Oorschot, M. P. M. Vierboom, M. Van de Keur, P. Kenemans, W. M. Kast, H. J. Geuze, and C. J. M. Melief. 1995. Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J.Exp.Med.* 182:163-174.
142. Barois, N., B. Saint-Vis, S. Lebecque, H. J. Geuze, and M. J. Kleijmeer. 2002. MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic*. 3:894-905.
143. Chow, A., D. Toomre, W. Garrett, and I. Mellman. 2002. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* 418:988-994.
144. Kleijmeer, M., G. Ramm, D. Schuurhuis, J. Griffith, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, A. Y. Rudensky, F. Ossendorp, C. J. Melief, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze. 2001. Reorganization of

multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J.Cell Biol.* 155:53-63.

145. Gatti, E. and P. Pierre. 2003. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15:468-473.
146. Landmann, S., A. Muhlethaler-Mottet, L. Bernasconi, T. Suter, J. M. Waldburger, K. Masternak, J. F. Arrighi, C. Hauser, A. Fontana, and W. Reith. 2001. Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J.Exp.Med.* 194:379-391.
147. Karlsson, L. and P. A. Peterson. 1992. The  $\alpha$  chain of H-2O has an Unexpected Location in the Major Histocompatibility Complex. *J.Exp.Med.* 176:477-483.
148. Rissoan, M. C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, M. R. de Waal, and Y. J. Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183-1186.
149. Inaba, K., J. P. Metlay, M. T. Crowley, and R. M. Steinman. 1990. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J.Exp.Med.* 172:631-640.
150. Bell, D., J. W. Young, and J. Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Adv.Immunol.* 72:255-324.
151. Palucka, K. and J. Banchereau. 1999. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J.Clin.Immunol.* 19:12-25.

152. Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, and D. P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* 2:1096-1103.
153. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18:767-811.
154. Smyth, M. J., D. I. Godfrey, and J. A. Trapani. 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat.Immunol.* 2:293-299.
155. Timmerman, J. M. and R. Levy. 1999. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu.Rev.Med.* 50:507-529.
156. Steinman, R. M., M. Pack, and K. Inaba. 1997. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol.Rev.* 156:25-37.
157. Van Tendeloo, V. F., H. W. Snoeck, F. Lardon, G. L. Vanham, G. Nijs, M. Lenjou, L. Hendriks, C. Van Broeckhoven, A. Moulijn, I. Rodrigus, P. Verdonk, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman. 1998. Nonviral transfection of distinct types of human dendritic cells: high-efficiency gene transfer by electroporation into hematopoietic progenitor- but not monocyte-derived dendritic cells. *Gene Ther.* 5:700-707.
158. Rea, D., F. H. Schagen, R. C. Hoeben, M. Mehtali, M. J. Havenga, R. E. Toes, C. J. Melief, and R. Offringa. 1999. Adenoviruses activate human dendritic cells without polarization

toward a T-helper type 1-inducing subset. *J. Virol.* 73:10245-10253.

159. Zhong, L., A. Granelli-Piperno, Y. Choi, and R. M. Steinman. 1999. Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 29:964-972.
160. Crystal, R. G. 1999. In vivo and ex vivo gene therapy strategies to treat tumors using adenovirus gene transfer vectors. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 43:S90-S99.
161. Vorburger, S. A. and K. K. Hunt. 2002. Adenoviral gene therapy. *Oncologist.* 7:46-59.
162. Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323.
163. He, T. C., S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:2509-2514.
164. Arthur, J. F., L. H. Butterfield, M. D. Roth, L. A. Bui, S. M. Kiertscher, R. Lau, S. Dubinett, J. Glaspy, W. H. McBride, and J. S. Economou. 1997. A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther.* 4:17-25.



165. Fallas, J. L., H. M. Tobin, O. Lou, D. Guo, D. B. Sant'Angelo, and L. K. Denzin. 2004. Ectopic expression of HLA-DO in mouse dendritic cells diminishes MHC class II antigen presentation. *J.Immunol.* 173:1549-1560.
166. Chen, W. S., N. J. Ede, D. C. Jackson, J. McCluskey, and A. W. Purcell. 1996. CTL recognition of an altered peptide associated with asparagine bond rearrangement - Implications for immunity and vaccine design. *J.Immunol.* 157:1000-1005.
167. Halaban, R., R. S. Patton, E. Cheng, S. Svedine, E. S. Trombetta, M. L. Wahl, S. Ariyan, and D. N. Hebert. 2002. Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway. *J.Biol.Chem.* 277:14821-14828.
168. Housseau, F., A. Moorthy, D. A. Langer, P. F. Robbins, M. I. Gonzales, and S. L. Topalian. 2001. N-linked carbohydrates in tyrosinase are required for its recognition by human MHC class II-restricted CD4(+) T cells. *Eur.J.Immunol.* 31:2690-2701.
169. Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J.Exp.Med.* 188:2357-2368.
170. Pardoll, D. M. and S. L. Topalian. 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 10:588-594.

171. Yewdell, J. W. and J. R. Bennink. 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu.Rev.Immunol.* 17:51-88.
172. Sercarz, E. E., P. V. Lehmann, A. Ametani, G. Benichou, A. Miller, and K. Moudgil. 1993. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu.Rev.Immunol.* 11:729-766.
173. Schreiber, H., T. H. Wu, J. Nachman, and W. M. Kast. 2002. Immunodominance and tumor escape. *Semin.Cancer Biol.* 12:25-31.
174. Miyazaki, T., P. Wolf, S. Tourne, C. Waltzinger, A. Dierich, N. Barois, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1996. Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 84:531-541.
175. Lightstone, L., R. Hargreaves, G. Bobek, M. Peterson, G. Aichinger, G. Lombardi, and R. Lechler. 1997. In the absence of the invariant chain, HLA-DR molecules display a distinct array of peptides which is influenced by the presence or absence of HLA-DM. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:5772-5777.
176. Purcell, A. W. 2004. Isolation and characterization of naturally processed MHC-bound peptides from the surface of antigen-presenting cells. *Methods Mol.Biol.* 251:291-306.
177. Chelius, D., A. F. Huhmer, C. H. Shieh, E. Lehmberg, J. A. Traina, T. K. Slattery, and Pungor E Jr. 2002. Analysis of the adenovirus type 5 proteome by liquid chromatography and

tandem mass spectrometry methods. *J.Proteome.Res.* 1:501-513.

178. Lanzavecchia, A. 1995. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity. *J.Exp.Med.* 181:1945-1948.

## **ANNEXES**

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier la Société de Recherche sur le Cancer (SRC) et Valorisation-Recherche Québec (VRQ) pour leur support ainsi que les membres du jury pour leur attention.

## **LISTE ET ACCORD DES COAUTEURS**

Jessy Tremblay

Sylvie Beaulieu

Mohamed-Rachid Boulassel

Jean-Pierre Routy

Bernard Massie

Réjean Lapointe

## ACCORD DES COAUTEURS

**Étudiant :** Angélique Bellemare-Pelletier

**Programme :** Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie et immunologie

**Auteurs :** Angélique Bellemare-Pelletier, Jessy Tremblay, Sylvie Beaulieu, Mohamed-Rachid Boulassel, Jean-Pierre Routy, Bernard Massie, Réjean Lapointe, Jacques Thibodeau

**Titre :** HLA-DO transduced in monocyte-derived dendritic cells modulates MHC class II antigen presentation

**État :** En soumission dans *The Journal of Immunology*

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Angélique Bellemare-Pelletier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Modulation de la présentation antigénique par le CMH de classe II : utilisation de HLA-DO dans les cellules dendritiques.

Signature



Date

19/08/04

## ACCORD DES COAUTEURS

**Étudiant :** Angélique Bellemare-Pelletier

**Programme :** Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie et immunologie

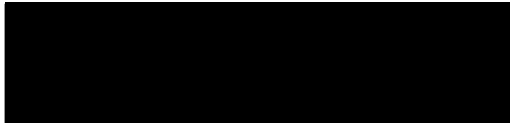
**Auteurs :** Angélique Bellemare-Pelletier, Jessy Tremblay, Sylvie Beaulieu, Mohamed-Rachid Boulassel, Jean-Pierre Routy, Bernard Massie, Réjean Lapointe, Jacques Thibodeau

**Titre :** HLA-DO transduced in monocyte-derived dendritic cells modulates MHC class II antigen presentation

**État :** En soumission dans *The Journal of Immunology*

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Angélique Bellemare-Pelletier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Modulation de la présentation antigénique par le CMH de classe II : utilisation de HLA-DO dans les cellules dendritiques.

Signature



Date 16 août 2004



## ACCORD DES COAUTEURS

**Étudiant :** Angélique Bellemare-Pelletier


**Programme :** Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie et immunologie

**Auteurs :** Angélique Bellemare-Pelletier, Jessy Tremblay, Sylvie Beaulieu, Mohamed-Rachid Boulassel, Jean-Pierre Routy, Bernard Massie, Réjean Lapointe, Jacques Thibodeau

**Titre :** HLA-DO transduced in monocyte-derived dendritic cells modulates MHC class II antigen presentation

**État :** En soumission dans *The Journal of Immunology*

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Angélique Bellemare-Pelletier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Modulation de la présentation antigénique par le CMH de classe II : utilisation de HLA-DQ dans les cellules dendritiques.



Date

*August 9/2004*

## ACCORD DES COAUTEURS

**Étudiant :** Angélique Bellemare-Pelletier

**Programme :** Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie et immunologie

**Auteurs :** Angélique Bellemare-Pelletier, Jessy Tremblay, Sylvie Beaulieu, Mohamed-Rachid Boulassel, Jean-Pierre Routy, Bernard Massie, Réjean Lapointe, Jacques Thibodeau

**Titre :** HLA-DO transduced in monocyte-derived dendritic cells modulates MHC class II antigen presentation

**État :** En soumission dans *The Journal of Immunology*

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Angélique Bellemare-Pelletier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Modulation de la présentation antigénique par le CMH de classe II : utilisation de HLA-DO dans les cellules dendritiques.

Signature

Date

2004 / Aug 9

## ACCORD DES COAUTEURS

Étudiant : Angélique Bellemare-Pelletier

Programme : Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie et immunologie

Auteurs : Angélique Bellemare-Pelletier, Jessy Tremblay, Sylvie Beaulieu,  
Mohamed-Rachid Boulassel, Jean-Pierre Routy, Bernard Massie, Réjean  
Lapointe, Jacques Thibodeau

Titre : HLA-DO transduced in monocyte-derived dendritic cells modulates MHC  
class II antigen presentation

État : En soumission dans *The Journal of Immunology*

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que  
Angélique Bellemare-Pelletier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui  
a pour titre Modulation de la présentation antigénique par le CMH de classe II :  
utilisation de HLA-DO dans les cellules dendritiques.

Date

9/9/04

## ACCORD DES COAUTEURS

**Étudiant :** Angélique Bellemare-Pelletier

**Programme :** Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie et immunologie

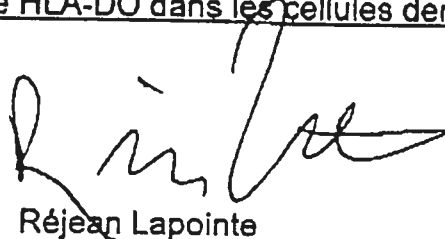
**Auteurs :** Angélique Bellemare-Pelletier, Jessy Tremblay, Sylvie Beaulieu, Mohamed-Rachid Boulassel, Jean-Pierre Routy, Bernard Massie, Réjean Lapointe, Jacques Thibodeau

**Titre :** HLA-DO transduced in monocyte-derived dendritic cells modulates MHC class II antigen presentation

**État :** En soumission dans *The Journal of Immunology*

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Angélique Bellemare-Pelletier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Modulation de la présentation antigénique par le CMH de classe II : utilisation de HLA-DO dans les cellules dendritiques.

Signature



Réjean Lapointe

Date

12 AOUT 2004